

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**Moduladores del sensor neuronal de calcio
DREAM: herramientas farmacológicas para el
estudio de su interactoma y
su aplicación en la enfermedad de Huntington**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pilar Cercós Pita

Directora:

Dra. Marta Gutiérrez Rodríguez

MADRID, 2018

© Pilar Cercós Pita, 2017



Dra. MARTA GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ, Científico titular.

CERTIFICA:

Que el trabajo reflejado en la presente memoria titulada “Moduladores del sensor neuronal de calcio DREAM: herramientas farmacológicas para el estudio de su interactoma y su aplicación en la enfermedad de Huntington” ha sido realizada en el Departamento de Química Médica III del Instituto de Química Médica (CSIC) por Dña. PILAR CERCÓS PITA y autoriza su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, Abril de 2017

Fdo. Marta Gutiérrez Rodríguez



Grupo de Peptidomiméticos

Instituto de Química Médica (CSIC)
Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid



CSIC

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Grupo de investigación Peptidomiméticos del Instituto de Química Médica (CSIC) bajo la dirección de la Dra. Marta Gutiérrez Rodríguez dentro del marco de los proyectos SAF2009-09323, SAF2012-32209 y BFU2015-67284-R financiados dentro del Plan Nacional por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO).

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral del subprograma de Formación de Personal Investigador (FPI) financiada por el MINECO. En el transcurso de esta tesis se ha realizado una estancia predoctoral de tres meses en el laboratorio dirigido por la Dra. Carmen Valenzuela del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBM, CSIC-UAM).

Me gustaría agradecer en primer lugar, a mi directora de tesis la Dra. Marta Gutiérrez a quien deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su acogida en este grupo de investigación, por su comprensión a lo largo de todo este tiempo, y muy especialmente, por todo el ánimo, apoyo y confianza depositado en este proyecto.

A la Prof. M^a Teresa García López, jefa del grupo de investigación cuando comencé esta tesis doctoral, mi gratitud por sus sabios consejos. También agradecer a todas las jefas y jefes (Mercedes, M^a Jesús P. De Vega, Rosario, Charo, Ana Castro, Nadine, Ana San Felix, M^a José Camarasa, Sonsoles, Eva, M^a Jesús, Paco Sánchez, Paco Ros, Maribel, Vicente y Ernesto) su acercamiento, los momentos tan divertidos que me han brindado y los consejos que me han dado.

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento:

A todo el personal de los servicios científico-técnicos del IQM, SPR y HPLC-MS, así como a los del Centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo, RMN, espectrometría de masas y microanálisis. Al Prof. J. R. Naranjo del Centro Nacional de Biotecnología y CIBERNED por llevar a cabo los ensayos de modulación de la interacción ATF6/DREAM. A la Dra. Carmen Valenzuela del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBM, CSIC-UAM) por su acogida en el

laboratorio, sus enseñanzas en electrofisiología y por proporcionarme los cultivos celulares.

A la Prof. Pilar Goya, directora del Instituto de Química Médica cuando entré, a la Prof. M^a Jesús Pérez, directora durante el transcurso de mi tesis porque siempre han hecho que todo resulte más fácil; y a la actual directora, la Dra. Ana Castro, por la que siento una gran admiración y cariño.

A la Sociedad Española de Química Terapéutica por la concesión de diferentes becas que han permitido presentar parte de este trabajo en congresos y por permitirnos formar parte del comité organizador de las diferentes ediciones del Simposio de jóvenes investigadores. Dentro de este marco me gustaría expresar especialmente mi gratitud a Ana Castro, Ana San Felix, Eva y Nico por ayudarnos en todo lo que ha estado en su mano. Asimismo, me gustaría agradecer a la SEQT y a Janssen Cilag S.A. el premio otorgado en el año 2015 en la Edición XVII de Premios a Jóvenes Investigadores de la SEQT.

A mis compañeros de grupo Bea, Geme, Pili, Wiki, Diego, Felipe y Paco Fueyo, me ha encantado pasar parte de estos años con vosotros, especialmente con Bea y la Geme, mis almas gemelas y sin duda lo mejor que me ha pasado durante la tesis. Gracias a ti Bea por haber estado en lo bueno y en lo malo, por haber compartido conmigo momentos tan importantes como el embarazo y nacimiento de Valeria (mi querida sobri), por haber hecho que me sienta parte de tu familia, por hacerme reir constantemente, por contar conmigo para todo! No tengo palabras para expresarte todo lo que te quiero, sin duda una amiga para toda la vida. A la señorita Bonache, mi segunda alma gemela! Gracias por ser como eres, por tus chismorreos, por hacerme reir, por escucharme y por contar con nosotras para todo! Ahora si podemos celebrar el nacimiento de Angel, Martín y Alejandro, nuestros hijos que sin haberlo planeado han nacido todos prácticamente al mismo tiempo, siempre juntas para todo!!!

Al resto de mis compañeros del IQM (Belén, Clara, Sergio, Marta, Andrés, Aída, Nieves, Carlos, Miriam, Valle, Anita, Dani, Ruth, Josefa, Felipe Reviriego, José Cumella, Mario, Pauli, Felipe Pérez Godillo, Javi Renau, Asier, Lole y Ana Gamo) gracias por vuestros consejos y los buenos momentos que hemos compartido. A Martín, Albi, Oskía y Bea, por haber formado parte de uno de los viajes más divertidos que he hecho. A Guada, una de las personas más fuertes que he conocido y con un corazón enorme. A Pedro González, que ha sido como un hermano para mi desde que

comenzamos la carrera!, no te creas que te vas a librar tan fácilmente de mi, nos volveremos a encontrar en el trabajo!. A Sonia, mi compañera de manualidades, un ejemplo a seguir en todos los sentidos.

A mis niños de “garantía juvenil” que han repoblado el instituto de gente joven. Gracias por ser como sois, os habéis ganado un huequecito en mi corazón.

A mis hermanos, porque me han hecho tener la mejor infancia del mundo, porque siempre han estado para todo y porque son lo mejor que tengo. A mis cuñadas y cuñado! Porque sois casi tan importantes como mis hermanos. A mis suegros por ayudarme constantemente con mis princesas. A mis padres, que aunque mi padre ya no esté han hecho que llegue hasta donde estoy. Especialmente a mi madre, que ha dado todo por nosotros. Gracias mami, soy lo que soy gracias a ti!. No creo que nadie haya hecho ni haga nada por mi como lo que has hecho tu, sin duda has demostrado constantemente que somos lo más importante para ti. A mis tíos y mis primos, porque hacen que nuestra gran familia sea como una piña. Os quiero familia!

A mi marido Javi, que aunque nunca ha entendido lo que es hacer una tesis me ha aguantado, apoyado y escuchado. Pero lo más importante, es que me ha dado a mis tres hijos, Carla, Leyre y Alejandro. Es sorprendente como nada más nacer se convierten en lo más importante de tu vida y como pasan a ser lo que más quieres. Gracias a los tres porque sois capaces de sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles, porque hacéis que todo lo que hago tenga sentido y porque aunque no lo sepáis formais parte de esta tesis, porque Carla nació al inicio, Leyre al final y Alejandro a punto de depositar. Os quiero a todos!

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| Notas sobre puntuación y nomenclatura..... | i |
| Abreviaturas..... | iii |
| Resumen..... | vii |
| Summary..... | xi |

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

| | |
|--|----|
| 1. Introducción General..... | 3 |
| 1.1 La enfermedad de Huntington..... | 3 |
| 1.1.1. El sistema de respuesta a proteínas mal plegadas y la enfermedad de Huntington..... | 5 |
| 1.1.2. Homeostasis del calcio y la enfermedad de Huntington..... | 8 |
| 1.2 El sensor neuronal de calcio DREAM..... | 9 |
| 1.2.1. Sensores neuronales de calcio..... | 9 |
| 1.2.1.1. Estructura general de los NCS: Dominios de unión a Ca^{2+} de tipo manos-EF..... | 10 |
| 1.2.1.2. Clasificación de los sensores neuronales de calcio..... | 11 |
| 1.2.2. Familia de las KChIPs..... | 12 |
| 1.2.2.1. Clasificación y localización celular de las KChIPs..... | 13 |
| 1.2.2.2. Los canales de potasio Kv4 y las subunidades auxiliares KChIPs..... | 14 |
| 1.2.3. KChIP3/DREAM/calsenilina..... | 16 |
| 1.2.3.1. El interactoma de DREAM..... | 17 |
| 1.2.3.2. Implicación de DREAM en la enfermedad de Huntington..... | 21 |
| 2. Objetivos Generales..... | 25 |
| 3. Bibliografía..... | 27 |

CAPÍTULO 1. Diseño, síntesis y evaluación biológica de la primera quimioteca de ligandos de DREAM como potenciales moduladores de Kv4.3/DREAM

| | | |
|------------|--|----|
| 1.1. | Introducción..... | 41 |
| 1.2. | Antecedentes..... | 43 |
| 1.3. | Objetivos..... | 45 |
| 1.4. | Resultados y discusión..... | 47 |
| 1.4.1. | Búsqueda de nuevos ligandos de DREAM. Elección del cabeza de serie..... | 47 |
| 1.4.1.1. | Síntesis de CL-888 (1.2) y compuestos prototipo 1.5-1.7 | 48 |
| 1.4.1.2. | Evaluación de la unión a DREAM mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR)..... | 52 |
| 1.4.2. | Optimización del cabeza de serie 1.6 : Diseño, síntesis y evaluación biológica. Estudios de relación estructura-actividad..... | 54 |
| 1.4.2.1. | Modificaciones en el anillo A. Optimización de condiciones de reacción..... | 55 |
| 1.4.2.2. | Modificaciones en el anillo B. Síntesis..... | 59 |
| 1.4.2.3. | Modificaciones en el espaciador. Síntesis..... | 65 |
| 1.4.2.4. | Estudio cualitativo de la capacidad de los compuestos sintetizados para interaccionar con DREAM. Relaciones estructura-actividad..... | 68 |
| 1.4.2.4.1. | Modificaciones en el anillo A..... | 68 |
| 1.4.2.4.2. | Modificaciones en el anillo B..... | 69 |
| 1.4.2.4.3. | Modificaciones en el espaciador..... | 73 |
| 1.4.3. | Nuevos derivados: Diseño, síntesis y evaluación biológica..... | 75 |
| 1.4.3.1. | Síntesis de los nuevos derivados 1.85-1.88 | 76 |
| 1.4.3.2. | Evaluación biológica de los nuevos derivados 1.85-1.88 | 77 |

| | |
|---|----|
| 1.4.3.2.1. Determinación de la unión de los nuevos derivados 1.85-1.88 a DREAM mediante SPR..... | 77 |
| 1.4.3.2.2. Efecto del derivado 1.83 en la modulación del complejo Kv4.3/DREAM..... | 79 |
| 1.5. Conclusiones..... | 83 |
| 1.6. Bibliografía..... | 85 |

CAPÍTULO 2. Diseño asistido por ordenador y síntesis de nuevos ligandos de DREAM como potenciales moduladores de Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM. Aplicación a la Enfermedad de Huntington

| | |
|---|-----|
| 2.1. Introducción | 91 |
| 2.1.1. Estructura de RMN de DREAM de ratón..... | 92 |
| 2.1.2. Estructura de rayos X del complejo Kv4.3/KChIP1..... | 94 |
| 2.2. Antecedentes..... | 98 |
| 2.3. Objetivos..... | 99 |
| 2.4. Resultados y discusión..... | 101 |
| 2.4.1. Construcción del modelo de hDREAM, búsqueda y análisis de sitios de unión..... | 101 |
| 2.4.2. Diseño de la quimioteca focalizada y estudios de docking molecular | 103 |
| 2.4.3. Síntesis de los derivados seleccionados de las series A y B..... | 107 |
| 2.4.4. Evaluación de las interacciones DREAM/ligando..... | 114 |
| 2.4.5. Definición del sitio de unión | 117 |
| 2.4.6. Modulación de las PPIs de DREAM | 120 |
| 2.4.6.1. Modulación de la interacción Kv4.3/DREAM..... | 120 |
| 2.4.6.1.1. Estudios electrofisiológicos del derivado 2.23 sobre los canales Kv4.3 y Kv4.3/DREAM..... | 120 |

| | |
|---|-----|
| 2.4.6.1.2. Efectos electrofisiológicos del derivado 2.9 sobre los canales K _v 4.3 y K _v 4.3/DREAM..... | 121 |
| 2.4.6.2. Modulación de la interacción ATF6/DREAM..... | 124 |
| 2.4.7. Estudio del paso de la barrera hematoencefálica por el método PAMPA | 126 |
| 2.4.8. Estudios <i>in vivo</i> en un modelo de la Enfermedad de Huntington. Ensayo de coordinación motora y aprendizaje..... | 127 |
| 2.4.8.1. Ensayo de coordinación motora en Rota-Rod..... | 127 |
| 2.4.8.2. Ensayo de memoria: test de reconocimiento de objeto nuevo..... | 128 |
| 2.5. Conclusiones..... | 131 |
| 2.6. Bibliografía..... | 133 |

CONCLUSIONES GENERALES.....139

PARTE EXPERIMENTAL

| | |
|---|-----|
| 1. Generalidades..... | 143 |
| 2. Procedimientos generales de síntesis..... | 145 |
| 2.1. Capítulo 1..... | 145 |
| 2.1.1. Síntesis del ácido 4-cloro-2-[3-(3,4-diclorofenil)carbamoilamino]benzoico CL-888 (1.2)..... | 145 |
| 2.1.2. Síntesis de los prototipos 1.5-1.7 | 145 |
| 2.1.3. Síntesis de amidas..... | 148 |
| 2.2. Capítulo 2..... | 174 |
| 2.2.1. Reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura..... | 174 |
| 2.2.2. Síntesis de amidas 2.51-2.66 | 182 |
| 2.2.3. Saponificación del grupo éster..... | 193 |
| 3. Métodos computacionales..... | 205 |
| 3.1. Modelado por homología de DREAM humana..... | 205 |

| | |
|--|-----|
| 3.2. Estudios de <i>docking</i> | 205 |
| 4. Ensayos Biológicos..... | 205 |
| 4.1. Determinación de las interacciones moleculares por SPR..... | 205 |
| 4.2. Definición del sitio de unión por mutagénesis dirigida..... | 206 |
| 4.3. Estudio de la modulación de Kv4.3/DREAM..... | 206 |
| 4.3.1. Cultivos celulares..... | 206 |
| 4.3.2. Expresión de los canales iónicos..... | 207 |
| 4.3.3. Transfección en células CHO..... | 207 |
| 4.3.4. Registro de las corrientes..... | 208 |
| 4.4. Estudio de la modulación de ATF6/DREAM..... | 209 |
| 4.4.1. Ensayo reportero de Luciferasa..... | 209 |
| 4.4.2. Experimentos de captura “Pull-down” | 209 |
| 4.4.3. Ensayo de coordinación motora en Rota-Rod..... | 209 |
| 4.4.4. Ensayo de memoria: test de reconocimiento de objeto nuevo..... | 210 |
| ANEXOS..... | 213 |

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides”, Pure & Appl. Chem., 1984, 56, 595). Mientras no se indique lo contrario, los aminoácidos se nombran mediante el sistema de símbolos de una o tres letras y pertenecen a la serie natural L.

Los compuestos sintetizados en esta Memoria se han nombrado según se describe en “*Nomenclature of Organic Chemistry. IUPAC Recommendations and Preferred Name 2013* (Blue book)”

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso del sistema inglés de puntuación en la numeración, se ha utilizado este sistema en la Memoria de esta Tesis. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas, desde su primera edición en Octubre de 2005 (<http://lema.rae.es/dpd/?key=punto>).

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Se han utilizado las abreviaturas y acrónimos recomendados por la *American Chemical Society* para el área de química orgánica, revisadas en las revistas *Journal of Organic Chemistry* (<http://pubs.acs.org/page/jocea/submission/authors.html>) y *Journal of Medicinal Chemistry* (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jmcmr/jmcmr_abbreviations.pdf), empleándose además los indicados a continuación.

| | |
|----------------|--|
| APP | Proteína precursora β -amiloide |
| ATF4 | Factor de transcripción activador 4 |
| ATF6 | Factor de transcripción activador 6 |
| β A | Péptido β -amiloide |
| BHE | Barrera hematoencefálica |
| BIP | Proteína de unión a inmunoglobulina |
| CaBPs | Proteínas de unión a Ca^{2+} |
| CaM | Calmodulina |
| CaMKII | Calmodulina quinasa II |
| Cav tipo T y L | Canales de calcio dependientes de voltaje tipo T y L |
| CHO | Células de ovario de hámster chino |
| COMU | Hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino-morfolino-carbenio |
| CREB | Proteína ligadora del elemento de respuesta AMPc |
| CREM | Elemento modulador de respuesta a AMPc |
| CtBP | Correpresor transcripcional |
| CTX3 | Cardiotoxina III de la cobra de Taiwán |
| D.I. | Índice de discriminación |
| DIPEA | N,N-diisopropiletilamina |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DPPs | Dipeptidil peptidasas |
| DR | DREAM |
| DRE | Elemento regulador en posición posterior a la caja TATA |
| DREAM | Modulador antagonista del sitio DRE |
| EA | Enfermedad de Alzheimer |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| EH | Enfermedad de Huntington |

| | |
|--------------------|---|
| eIF2 α | Factor de iniciación eucariota 2 |
| ERAD | Degradación de proteínas asociadas al retículo endoplasmático |
| GalT2 β -1,3 | Galactosiltransferasa |
| Gb | Glibencamida |
| GCAPs | Proteínas activadoras de la guanilato ciclasa |
| GRKs | Quinasas de receptores acoplados a proteínas G |
| GST-DREAM | DREAM unido a una resina de sefarosa-glutation |
| HATU | Hexafluorofosfato (V) de 1-óxido-3-(bis(dimetilamino)metilen)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina |
| hDREAM | DREAM humana |
| HEK | Células embrionarias de riñón humano |
| HMBC | Correlación heteronuclear a larga distancia |
| HOBt | 1-hidroxibenzotriazol |
| HPLC | Cromatografía líquida de alto rendimiento |
| HPLC-MS | Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas |
| HSQC | Correlación heteronuclear cuántica simple |
| Htt | Huntingtina |
| HXK1 | Hexoquinasa I |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| IFD | Docking inducido |
| IRE1 | Proteína reguladora de inositol 1 |
| I _{SA} | Corriente transitoria tipo A en neuronas |
| I _{TO} | Corriente transitoria tipo A en corazón |
| KChIP | Proteína de interacción con canales de potasio |
| K _V | Canales de potasio dependientes de voltaje |
| LTP | Potenciación sináptica a largo plazo |
| mHtt | Huntingtina mutada |
| NAPPA | Matriz de proteína programable de ácido nucléico |
| NCS | Sensores neuronales de calcio |
| NHS | N-hidroxisulfonamida |
| NMDR1 | Receptor <i>N</i> -metil-D-aspartato |
| NMM | <i>N</i> -metilmorfolina |
| PAMPA | Ensayo de absorción en paralelo con membranas artificiales |
| patch clamp | Técnica de fijación de voltaje en parches de membrana |

| | |
|---------------------|---|
| PERK | Proteína quinasa residente en el retículo endoplásmico |
| poliQ | Poliglutamínica |
| PPIs | Interacciones proteína-proteína |
| ppm | Partes por millón |
| PS | Presenilinas |
| PSD95 | Proteína de densidad postsináptica 95 |
| PyBOP | Hexafluorofosfato de benzotriazolil- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidino) fosfonio |
| PyOAP | Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tria (pirrolidino)fosfonio |
| rDREAM | DREAM ratón |
| Rdto. | Rendimiento |
| RE | Retículo endoplásmico |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| Rp | Repaglinida |
| RUs | Unidades de resonancia |
| SAR | Relaciones estructura-actividad |
| SPR | Resonancia de plasmón de superficie |
| t.a. | Temperatura ambiente |
| τ_{act} | Constante de activación |
| τ_{f} | Constante de inactivación rápida |
| t_{R} | Tiempo de retención |
| τ_{rec} | Constante de recuperación |
| τ_{s} | Constante de inactivación lenta |
| TSHR | Receptor de la hormona estimulante del tiroides |
| TTF-1 | Factor 1 de transcripción nuclear tiroideo |
| Ubc9 | Enzima E2 de conjugación |
| UPR | Respuesta a las proteínas mal plegadas |
| VILIPs | Proteínas similares a visinilina |
| WT | Genotipo salvaje |

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La enfermedad de Huntington (EH) se caracteriza por una combinación de alteraciones motoras, psiquiátricas y cognitivas. En la actualidad, se encuentra entre las patologías neurodegenerativas carentes de un tratamiento que incida de manera efectiva en su generación y desarrollo. Hasta el momento, los tratamientos existentes sólo han logrado paliar los síntomas, sin incidir en la causa de los mismos. Por tanto, la búsqueda de nuevas estrategias que ayuden a elucidar las bases moleculares de esta enfermedad y sirvan como punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos, es crucial. En este sentido, esta Memoria se ha orientado al estudio de una estrategia novedosa mediante la búsqueda de moléculas pequeñas que modulen las interacciones proteína-proteína del sensor neuronal de calcio DREAM involucradas en la enfermedad de Huntington. La finalidad es aportar conocimiento en los procesos implicados en la generación y progresión de esta patología.

DREAM, también conocida como calsenilina o KChIP3, es una proteína de unión a calcio de la superfamilia de los sensores neuronales de calcio con características estructurales de tipo manos-EF. La unión de calcio a los dominios mano-EF de DREAM, origina cambios estructurales que afectan a su capacidad de unión a sitios específicos del ADN y a la interacción con otras proteínas, modificando sus funciones biológicas. A nivel del sistema nervioso, la acumulación excesiva de Ca^{2+} se ha asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentra la EH. De hecho, se ha descrito que la huntingtina (Htt) mutada induce un aumento de toxicidad celular, desestabilizando la homeostasis del calcio, lo que da lugar a la EH. Recientemente, se ha identificado una disminución en los niveles de DREAM relacionada con la activación y liberación del factor de transcripción ATF6, involucrado en el proceso de plegamiento correcto de proteínas. Es bien conocido, que las enfermedades neurodegenerativas presentan como característica común la acumulación de proteínas mal plegadas. En condiciones patológicas los componentes del sistema de plegamiento de proteínas UPR (ATF6, IRE1 y PERK) se encuentran alterados, dando lugar a la muerte neuronal. Por otra parte, se ha establecido que DREAM tiene un papel clave en procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje a través de la interacción con los canales de potasio Kv4.3. El déficit de aprendizaje y el de memoria son los primeros síntomas clínicos de la enfermedad de Huntington, y aparecen en los pacientes mucho antes que los síntomas motores. Como consecuencia, dada la importancia de la interacción de DREAM con ATF6 y Kv4.3, la modulación de

estos complejos podría abrir nuevas vías en la búsqueda de tratamientos eficaces en la enfermedad de Huntington.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la búsqueda de nuevos ligandos de DREAM como herramientas farmacológicas para estudiar la red de interacciones proteína-proteína de DREAM, centrándonos en su interacción con el canal de potasio Kv4.3 y con el factor de transcripción ATF6. Estas nuevas herramientas farmacológicas permitirán generar conocimiento sobre la modulación del interactoma de DREAM y su validación como diana en la EH. Además, podrían ser la base para la búsqueda de fármacos innovadores y eficaces para el tratamiento de la EH. Para la consecución de este objetivo, se han utilizado dos estrategias químico-médicas. La primera, se ha basado en la estructura de ligandos conocidos de proteínas homólogas a DREAM, y la segunda, en la estructura tridimensional de la diana. Los resultados de cada una de estas dos aproximaciones han conformado, respectivamente, el Capítulo 1 y 2 de la presente Memoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1

El primer capítulo describe la identificación de nuevos ligandos de DREAM a partir de la estructura de compuestos conocidos que interaccionan con otros sensores neuronales de calcio. Los resultados más relevantes de este capítulo se resumen a continuación:

1.- Se ha identificado un cabeza de serie a partir del cual se ha desarrollado un proceso de optimización mediante la incorporación de diversas modificaciones estructurales. La posterior evaluación biológica, mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR), ha permitido definir los requisitos estructurales más relevantes para incrementar la capacidad de unión de los ligandos a la proteína DREAM.

2.- Se ha estudiado el efecto funcional del compuesto más potente en la modulación del complejo Kv4.3/DREAM. Los estudios de electrofisiología han permitido identificar a este compuesto como un activador de la corriente generada por los canales Kv4.3. Este activador, junto con el recientemente descrito NS5806, son los únicos activadores de Kv4.3 conocidos hasta la fecha.

Capítulo 2

El segundo capítulo describe la búsqueda de nuevos ligandos de DREAM utilizando métodos computacionales basados en la estructura 3D de la diana. Los resultados más relevantes se resumen a continuación:

1.- Mediante técnicas de modelización por homología se han generado varios modelos de hDREAM que, a través de estudios de docking molecular, han permitido seleccionar una quimioteca virtual de potenciales ligandos de hDREAM. En base a estos estudios se han seleccionado una serie de derivados de fenilacetamidas como candidatos para interactuar con la proteína DREAM.

2.- Los derivados seleccionados han sido evaluados por SPR, presentando una capacidad de interacción con DREAM superior a los prototipos de partida.

3.- Mediante estudios de mutagenesis dirigida, se ha validado experimentalmente el sitio de unión de los nuevos ligandos a DREAM.

4.- Se ha estudiado el efecto de los ligandos más potentes en SPR sobre la modulación de los complejos Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM. Los estudios de electrofisiología han permitido identificar a dos compuestos como inhibidores de las corrientes generadas por los canales Kv4.3. Uno de estos compuestos también inhibió la interacción ATF6/DREAM, modificando la transactivación dependiente de ATF6 de manera concentración-dependiente.

5.- Los dos inhibidores identificados revirtieron los problemas motores observados en ratones modelo de la enfermedad de Huntington, tras 12 semanas de tratamiento. Sin embargo, a las 20 semanas, ninguno revirtió dichos problemas. Los ensayos de pérdida de memoria a corto plazo han mostrado que ambos inhibidores revierten el fenotipo. Sin embargo, sólo el derivado más potente fue capaz de revertir el fenotipo de pérdida de memoria a largo plazo.

SUMMARY

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Huntington's disease (HD) is characterized by a combination of motor, psychiatric, and cognitive impairment. Nowadays, it is a neurodegenerative pathology devoided of a treatment that has an impact on its generation and development. Until now, the existing treatments only alleviate the symptoms, without targeting their cause. Therefore, it is crucial the search for new strategies that unravel the molecular basis of this disease and establish the basis for the development of new drugs. In this sense, this Report has been oriented to the study of a novel strategy focused on the search of small molecules that modulate the protein-protein interactions of the neuronal calcium sensor DREAM involved in HD. The aim is to gain knowledge on the processes involved in the generation and progression of this pathology.

DREAM, also known as calsenilin or KChIP3, belongs to the superfamily of EF-hand calcium binding proteins. The binding of calcium to the DREAM hand-EF domains triggers structural changes that affect their ability to bind to specific DNA sites and to interact with other proteins, modifying their biological functions. At the level of nervous system, the excessive accumulation of calcium has been associated with several neurodegenerative diseases, among them Huntington's disease. In fact, mutated huntingtine has been reported to induce an increase in cellular toxicity, disrupting calcium homeostasis, which results in HD. In addition, a decrease of DREAM levels has recently been described, which has been related to the activation and release of ATF6 transcription factor. This transcription factor is involved in the correct protein folding process. It is well known that neurodegenerative diseases have, as a common feature, the accumulation of poorly folded proteins. Under pathological conditions the components of the unfolding protein response UPR (ATF6, IRE1 and PERK) are altered, leading to neuronal death. On the other hand, a key role of DREAM in synaptic plasticity and learning processes has been established by its interaction with the potassium channel Kv4.3. Learning and memory deficits are the first clinical symptoms of Huntington's disease, and appear in patients long before motor symptoms. As a consequence, considering the relevance of the interaction of DREAM with ATF6 and Kv4.3, the modulation of these complexes could open new avenues on the search for effective treatments of Huntington's disease.

The general objective of this Dissertation has been the search for new DREAM ligands as pharmacological tools to study DREAM protein-protein interaction network, focusing on its interaction with the Kv4.3 potassium channel and the transcription factor ATF6.

These new pharmacological tools will allow to gain knowledge on the modulation of the DREAM interactome and its validation as a target in HD. In addition, they could establish the basis for the search for innovative and effective drugs for the treatment of HD. To achieve this goal, two medicinal chemistry strategies have been applied. The first one is based on the structure of known ligands of homologous proteins, and the second one, on the three-dimensional structure of DREAM. The results of each of these two approaches have respectively made up the Chapter 1 and 2 of this Report.

RESULTS AND DISCUSSION

Chapter 1

The first chapter describes the identification of new DREAM ligands from the structure of known compounds that interact with other neuronal calcium sensors. The most relevant results of this chapter are summarized below:

1.- A hit has been identified and then an optimization process has been developed through the incorporation of various structural modifications. Subsequent biological evaluation, using surface plasmon resonance (SPR), has allowed to define the most relevant structural requirements for binding to DREAM.

2.- The functional effect of the most potent compound on the modulation of the K_v4.3/DREAM complex has been studied. Electrophysiology studies have allowed to identify this compound as an activator of the current generated by K_v4.3 channels. This activator, along with the recently described NS5806, are the only K_v4.3 activators known to date.

Chapter 2

The second chapter describes the search for new DREAM ligands using computational methods based on the 3D structure of the protein. The most relevant results are summarized below:

1.- By means of homology modeling techniques, several hDREAM models have been generated which, through molecular docking studies, have allowed the screen of a focused virtual library of potential hDREAM ligands. These studies have guided the selection of a series of phenylacetamide derivatives as candidates for interacting with the DREAM protein.

2.- The evaluation by SPR of the selected derivatives have showed that the new compounds have a higher capacity of interaction with DREAM than the prototypes.

3.- The binding site of the new ligands to DREAM has been experimentally validated, through site directed mutagenesis studies.

4.- The most potent ligands has been selected to study their capacity to modulate K_v4.3/DREAM and ATF6/DREAM complexes. Electrophysiology studies have allowed the identification of two compounds as inhibitors of the currents generated by K_v4.3 channels. One of them also inhibited the ATF6/DREAM interaction, by modifying ATF6-dependent transactivation in a concentration-dependent manner.

5.- The two identified inhibitors reverted the motor problems observed in HD model mice, after 12 weeks of treatment. However, at 20 weeks, none reverted such problems. Short-term memory loss trials have shown that both inhibitors revert the phenotype. However, only the most potent derivative was able to revert the phenotype of long-term memory loss.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (EH), también conocida como Corea de Huntington, es una enfermedad neurológica progresiva, hereditaria y degenerativa para la que no existe cura. La EH fue descrita por primera vez en 1872 por el médico norteamericano George Huntington, y fue precisamente él quien identificó las manifestaciones clínicas y el carácter hereditario de la enfermedad.¹ Sin embargo, no fue hasta el año 1993 en el que se determinó la etiología de la enfermedad.²

La EH es una enfermedad autosómica dominante producida por una mutación genética localizada en la región codificante del gen *HD*. Este gen codifica una proteína de 350 KDa llamada huntingtina (Htt), cuya expresión no está limitada al sistema nervioso (neuronas y glía) sino que, también tiene lugar en gran variedad de tejidos. La mutación que causa la enfermedad consiste en una expansión de repeticiones de tripletes CAG que codifican una región poliglutámica (poliQ) en el extremo *N*-terminal de la Htt dando lugar a acumulaciones de proteínas largas (mHtt). Esto deriva en muerte neuronal en regiones específicas del cerebro, siendo la principal zona afectada el núcleo estriado.²⁻³ En condiciones normales, las personas no afectadas poseen de 6 a 34 repeticiones de tripletes CGA y las que tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad tienen más de 35 repeticiones. Además, cuanto mayor sea el número de repeticiones, la gravedad de la enfermedad es mucho mayor.²

Hoy en día, la EH se considera una enfermedad rara distribuida en todo el mundo en igual proporción entre hombres y mujeres. Como se recoge en la Figura 1, esta enfermedad presenta una prevalencia de 5.7 afectados por cada 100000 habitantes en Europa Occidental, Australia y América del Norte, y 0.4 afectados por cada 100000 habitantes en Asia y en la población de raza negra. La mayor tasa de prevalencia se da en la región de Zulia, junto al lago Maracaibo, en la isla de Tasmania, al sur de Australia, y en Moray Firth, al nordeste de Escocia.⁴ Aunque en España no hay

elaborado un censo, se estima que hay entre 3000 y 4000 afectados, detectándose una mayor incidencia en las Islas Baleares y Extremadura.^{4e}

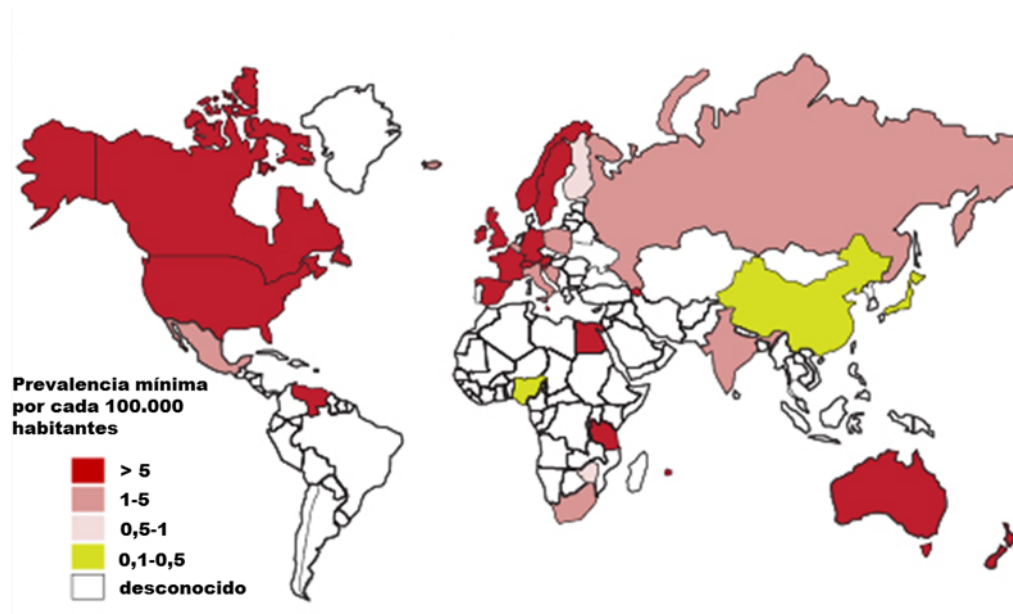


Figura 1. Prevalencia estimada de la EH en el mundo^{4e}

La edad promedio de inicio de la EH es 40 años, sin embargo, un 10% de las personas afectadas desarrollan síntomas antes de los 20 años (EH juvenil) y otro 10% después de haber cumplido los 55 años. Este rango de aparición es característico en enfermedades asociadas a mutaciones dinámicas, de manera que el número de repeticiones del triplete CAG será inversamente proporcional a la edad de aparición de la enfermedad.⁵

Clínicamente, la EH se puede identificar por alteraciones del comportamiento, alteraciones afectivas y cognitivas, asociadas a una disfunción motora progresiva (movimientos tipo corea). Dentro de los trastornos psiquiátricos, se incluyen cambios de personalidad, trastornos afectivos, agitación o apatía, alucinaciones, cuadros de esquizofrenia, falta de atención en conversaciones, descuido en el aseo personal y trastornos del sueño. Atendiendo a los trastornos cognitivos, inicialmente, tiene lugar una alteración de la memoria reciente, hasta desarrollar demencia, que lleva a la incapacidad para realizar las actividades cotidianas. En cuanto a los trastornos motores, al inicio de la enfermedad, los movimientos anormales son sutiles y a medida que avanza la enfermedad se hacen más prominentes y no suprimibles, causando trastorno funcional. Con la evolución de la enfermedad los movimientos tipo corea empeoran, de manera que se alteran el equilibrio y los movimientos voluntarios.⁶

La mayoría de los enfermos con la EH mueren pasados 15-20 años desde la aparición de los primeros síntomas, como consecuencia de problemas de salud derivados de los trastornos motores (axfisia), infecciones (neumonía) o problemas cardiacos. Durante la enfermedad, los pacientes son tratados con fármacos paliativos para mejorar los síntomas de corea, depresión y ansiedad.⁷ Algunos de los medicamentos utilizados para el tratamiento de la EH son principalmente antagonistas dopaminérgicos, como los antipsicóticos haloperidol o clorpromazina. Estos fármacos ayudan al control de la parte emocional, como la agresividad, alucinaciones... pero no controlan e incluso a veces empeoran los movimientos tipo corea. En esta dirección, tetrabenazina y reserpina, se administran para atenuar los movimientos tipo corea. La depresión se trata con antidepresivos estándar y la ansiedad con benzodiazepinas de acción prolongada.⁸

Hasta el momento, los tratamientos existentes sólo han logrado paliar los síntomas, sin incidir en la causa de los mismos. Por tanto, es necesario la búsqueda de nuevas estrategias que ayuden a elucidar las bases moleculares de esta enfermedad y sirvan como base para el desarrollo de nuevos fármacos. Con respecto a los mecanismos asociados al desarrollo de la EH, se ha descrito que un mal funcionamiento de dos procesos íntimamente relacionados está implicado en el progreso de la enfermedad, el mecanismo de respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR) y el de la homeostasis del Ca^{2+} .

1.1.1. El sistema de respuesta a proteínas mal plegadas y la enfermedad de Huntington

Una de las características más importantes de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Huntington, es la acumulación en el cerebro de agregados de proteínas mal plegadas.⁹ Desde el descubrimiento de estos agregados, se ha abierto un extenso debate sobre su implicación en el inicio y en el transcurso de la enfermedad, sugiriéndose que estos depósitos no parecen ser la causa de la enfermedad, sino una consecuencia de mecanismos protectores de la célula, cuya finalidad es eliminar oligómeros solubles.¹⁰ Hoy en día se considera que un mal funcionamiento del sistema de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR: unfolding protein response) está íntimamente relacionado con las enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentran la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer o las enfermedades priónicas.¹¹

El orgánulo celular que en mayor medida participa en el plegamiento, transporte de las proteínas de membrana y en la ruta secretora es el retículo endoplásmico (RE).¹² Para poder llevar a cabo esta función, el retículo endoplásmico contiene multitud de chaperonas que están implicadas en el plegamiento y degradación de proteínas. Existe una gran variedad de factores que pueden afectar a la homeostasis del retículo endoplásmico y, por tanto, a los procesos de plegamiento, lo que da lugar a la formación de conglomerados proteicos y al estrés del retículo endoplásmico. Entre estos factores, cabe destacar alteraciones redox en la célula,¹³ fallos en el proceso natural de transcripción y traducción de proteínas, aparición de mutaciones y finalmente, alteración de la regulación de la homeostasis del calcio.¹⁴ Es precisamente esta alteración en los niveles de calcio, lo que detectan las chaperonas implicadas en el plegamiento.

En lo que concierne al plegamiento de proteínas, las células eucariotas han desarrollado mecanismos de control para asegurar la homeostasis proteica. Así, las células disponen de dos vías diferenciadas pero relacionadas entre sí: la degradación de proteínas asociadas al retículo endoplasmático (ERAD)¹² y la respuesta a proteínas mal plegadas.¹⁵ Mientras que a través del sistema ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) la célula elimina las proteínas defectuosas en un proceso que implica su retrotranslocación al citoplasma, ubiquitinación y degradación en el proteasoma,¹⁶ en la vía UPR la célula ajusta la capacidad del RE para mitigar una situación de estrés. Por tanto, el sistema UPR consiste en una regulación de la expresión génica, que tiene como consecuencia el aumento de la síntesis de chaperonas del retículo endoplásmico, una reducción de la síntesis de proteínas y de su velocidad de traslación al mismo y finalmente, un incremento de otras proteínas que intervienen en el plegamiento, así como de elementos del ERAD.¹⁷

La señalización de la UPR involucra al menos tres sensores distintos localizados en la membrana del retículo endoplasmático: IRE1 (*inositol-requiring protein-1*), PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) y el factor de transcripción ATF6 (*activating transcription factor-6*); además de diversos factores transcripcionales, que reprograman la expresión de genes para conseguir la adaptación al estrés o, por el contrario, inducir la apoptosis. En condiciones fisiológicas, los sensores IRE1, PERK y ATF6 se encuentran inhibidos por su asociación con la chaperona GRP78, más conocida como BIP (*immunoglobulin binding protein*), mientras que, en situaciones de estrés moderado, BIP se disocia de ATF6 e IRE1 para aumentar la capacidad de plegado en el RE. La disociación hace que PERK e IRE1 formen homodímeros,

promoviendo su fosforilación y activando el mecanismo de adaptación UPR (Figura 2).¹⁸

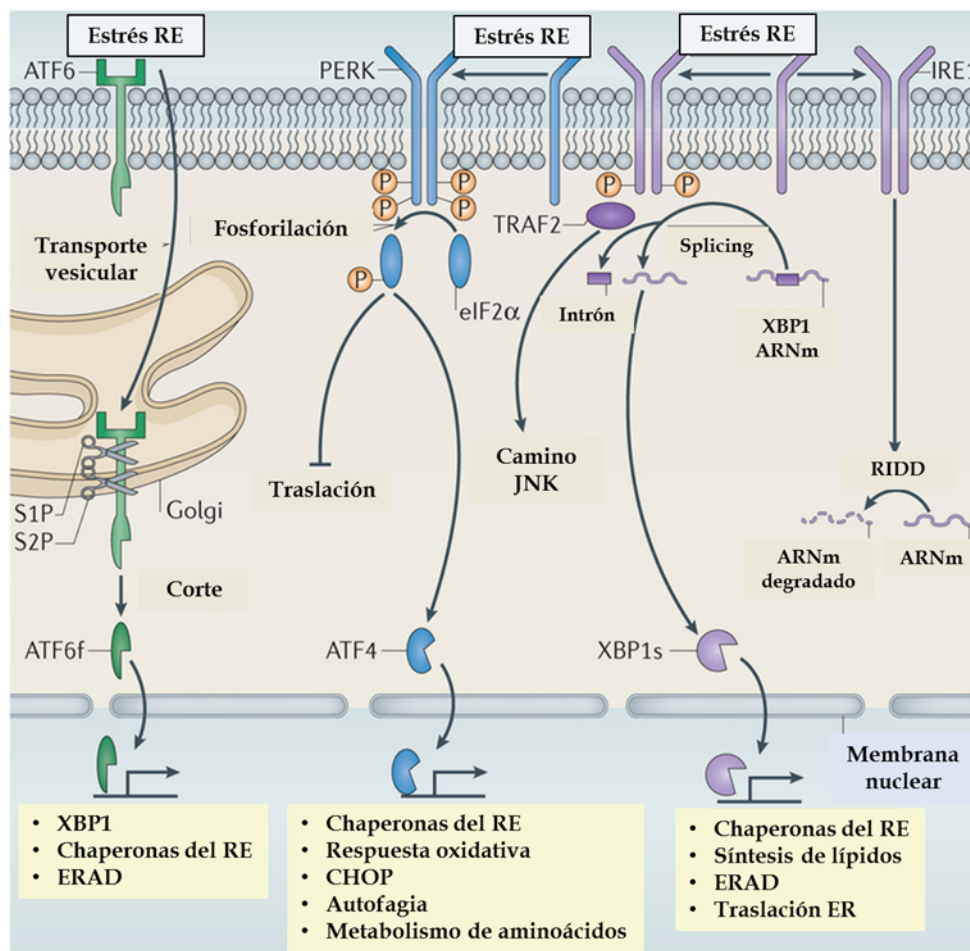


Figura 2. Cascada de señalización de la vía UPR activada por la acumulación de proteínas mal plegadas para disminuir el estrés del RE. En el esquema se muestran las distintas rutas una vez que los sensores de estrés IRE1, PERK y ATF6. Figura adaptada de Hetz *et al.*^{18e}

A continuación se comentan en más detalle cada uno de los sensores mencionados:

IRE1 es una proteína transmembrana del retículo endoplasmático con un dominio quinasa y otro endorribonucleasa. En condiciones fisiológicas, IRE1 se encuentra inhibido por su asociación con BIP y, tras la acumulación de proteínas mal plegadas, se disocia y dimeriza, lo que permite que los dominios de quinasa se autofosforilen, favoreciendo que el dominio endorribonucleasa se una al ARNm que codifica el factor de transcripción XBP1 modificado. Finalmente, XBP1 se transloca al núcleo donde se

une a promotores de genes que codifican chaperonas y enzimas involucradas en el proceso ERAD (Figura 2).¹⁹

PERK, al igual que IRE1, es una proteína transmembrana con un dominio quinasa que se activa tras la disociación de BIP como consecuencia de la acumulación de proteínas mal plegadas. La dimerización de PERK, y consiguiente autofosforilación, permite la fosforilación de la Ser51 del factor de iniciación eIF2 α , clave para la traducción de proteínas.²⁰ El efecto neto de eIF2 α es aliviar el estrés a través de la reducción de sobrecarga de péptidos en el RE. Esto es posible gracias a la disminución de la traducción de la mayoría de los ARNm, a excepción de ATF4, tras la fosforilación de eIF2 α . La función de ATF4 consiste en permitir la síntesis proteica horas después del estrés. Para ello, la fosforilación de eIF2 α permite que ATF4 se active e induzca la transcripción de GADD34, una proteína citosólica que se une a PP1C para desfosforilar eIF2 α (Figura 2).²¹

ATF6 es una proteína transmembrana del retículo endoplásmico asociada a BIP. En condiciones de estrés del RE, ATF6 se libera y migra al aparato de Golgi, donde se pliega y, por la acción de las proteasas SP1 y SP2, se escinde principalmente en dos dominios (Figura 2).²² El dominio N-terminal de ATF6 se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de diversos genes diana que codifican chaperonas, XBP1 y enzimas implicadas en el proceso ERAD.²³

Los mecanismos en la UPR pueden resultar más complejos que los comentados hasta el momento. En un proceso patológico, la vía UPR desencadena la muerte celular o apoptosis, como consecuencia de un estrés prolongado del RE.^{18e} En el caso de la Enfermedad de Huntington, todavía no se ha elucidado totalmente el mecanismo. Sin embargo, la patología neurodegenerativa de la EH se ha asociado a un déficit en el proceso de activación de la vía de ATF6.²⁴

1.1.2. Homeostasis del calcio y la enfermedad de Huntington

La entrada masiva de Ca²⁺ en las células conlleva una alteración de las cascadas de señalización intracelular, así como, del correcto funcionamiento de los segundos mensajeros. Esta descompensación en la homeostasis del calcio, provoca que el catión calcio no se pueda compartimentar en los reservorios celulares y, como consecuencia, se activen diversos mecanismos neurotóxicos que, en última instancia, culminan en la muerte celular.²⁵

A nivel del sistema nervioso, la acumulación excesiva de Ca^{2+} se ha asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas,²⁶ entre las que se encuentra la enfermedad de Huntington,²⁷ describiéndose varios mecanismos relacionados con una alteración de los niveles de calcio, que son importantes en el progreso de estas patologías. Entre ellos, cabe destacar: la alteración de los sistemas de regulación del calcio, una disfunción mitocondrial, la desregulación de la actividad de los canales de calcio o la excitotoxicidad.^{26c, 26d, 28}

Se ha descrito que la proteína Htt mutada (mHtt) presenta una pérdida de función normal induciendo una “ganancia de función tóxica”, que da lugar a la EH.²⁹ Dentro de las funciones tóxicas cabe destacar la desestabilización de la señal de Ca^{2+} neuronal. Por lo tanto, la desregulación de la homeostasis del calcio celular es un fenotipo que claramente se observa en neuronas de enfermos de Huntington. Esta pérdida de la homeostasis del calcio se traduce finalmente en daño funcional y muerte neuronal.³⁰ Además, el análisis transcriptómico de cuerpo estriado en modelos animales y en pacientes con EH, muestra una expresión modificada de numerosos genes importantes en la homeostasis del calcio.³¹ Uno de ellos, el *KCNIP2* (Potassium Channel Interacting Protein 2),³² es un miembro de la familia de los sensores neuronales de calcio a la cual pertenece la proteína DREAM (DRE-antagonist modulator).

1.2. EL SENSOR NEURONAL DE CALCIO DREAM

1.2.1. Sensores neuronales de calcio

La especificidad de los efectos del calcio en la fisiología neuronal viene determinada por la magnitud y la localización espacial de la señal de calcio. Para que en la célula tenga lugar una determinada acción fisiológica es necesario la transducción de la señal generada por variaciones en la concentración de los iones calcio.³³ Para conseguir esta especificidad, la célula dispone de una maquinaria basada en “sensores de calcio” capaz de discriminar distintas señales de calcio mediante su expresión, localización y la afinidad que presenta cada uno de ellos por el catión calcio. A nivel neuronal, es la familia de los sensores neuronales de calcio quien contribuye, entre otras, a la especificidad global de la señalización del calcio.³⁴

En humanos, se han descrito dos familias de sensores de calcio: las proteínas de unión a Ca^{2+} (CaBPs) y los sensores neuronales de calcio (NCS).^{34b, 35} La semejanza entre los miembros de ambas familias, hace que esta clasificación se haya basado en una cuestión histórica y no en diferencias estructurales, de localización o función. Las

CaBPs y los NCS presentan una estructura basada en un ancestro común, la calmodulina (CaM). Es importante resaltar que la expansión evolutiva de CaM, ha provocado un aumento de la diversidad, sensibilidad y especificidad en la señalización de Ca^{2+} . De hecho, mientras que CaM se expresa en una gran variedad de células, la presencia de los NCS y las CaBPs queda limitada al sistema nervioso (neuronas y fotorreceptores), donde juegan un papel importante en la regulación del tráfico y crecimiento neuronal, la plasticidad sináptica, el control de la transcripción génica, la regulación de canales iónicos y la participación en procesos de adaptación de la luz en la retina, entre otros.³⁶ El tema objeto de esta Memoria está directamente relacionado con la familia de los NCS.

1.2.1.1. Estructura general de los NCS: Dominios de unión a Ca^{2+} de tipo mano-EF

Los NCS poseen una estructura basada en motivos de unión a calcio, denominados *manos-EF*,³⁷ que les confiere la capacidad de participar en la especificidad global de la señalización de calcio. El término *mano-EF* hace referencia a una secuencia de 29 residuos organizados en dos hélices α separadas por un bucle (Fig 4.A y 4.B).³⁸ El nombre de *mano-EF* proviene de la disposición espacial que presentan las hélices, de manera que éstas se sitúan perpendicularmente en una orientación que imita la posición del pulgar y del dedo índice de una mano humana (Figura 4.B).³⁹ El bucle situado entre las dos hélices α tiene de 12 a 14 aminoácidos, de los cuáles, los situados en las posiciones x, y, z, -x, -y aportan un oxígeno para la coordinación con el catión (Figura 4). Además, posee una secuencia consenso característica, DXDXDG, donde D representa ácido aspártico, X cualquier aminoácido y G glicina (Figura 4.A y 4.B).⁴⁰ En el caso del aminoácido en la posición -y, el oxígeno que aporta pertenece al grupo carbonilo de la cadena hidrocarbonada principal. Además, en la posición -z se encuentra un ácido glutámico o aspártico que contribuye con dos oxígenos a la unión (Figura 4). De esta manera, cada *mano-EF* se puede coordinar con el catión calcio a través de siete oxígenos en una disposición espacial bipirámide pentagonal.³⁸

Aunque todos los NCS contienen cuatro *manos-EF*, organizadas en dos dominios, no todas las *manos-EF* son capaces de unir calcio. Así por ejemplo, una secuencia C-P (cisteína-prolina) o un puente salino en el lazo situado entre las dos α -hélices puede desactivar la unión a calcio.⁴⁴ Estas características hacen que cada familia de la superfamilia de los NCS presente un cierto grado de especificidad funcional.

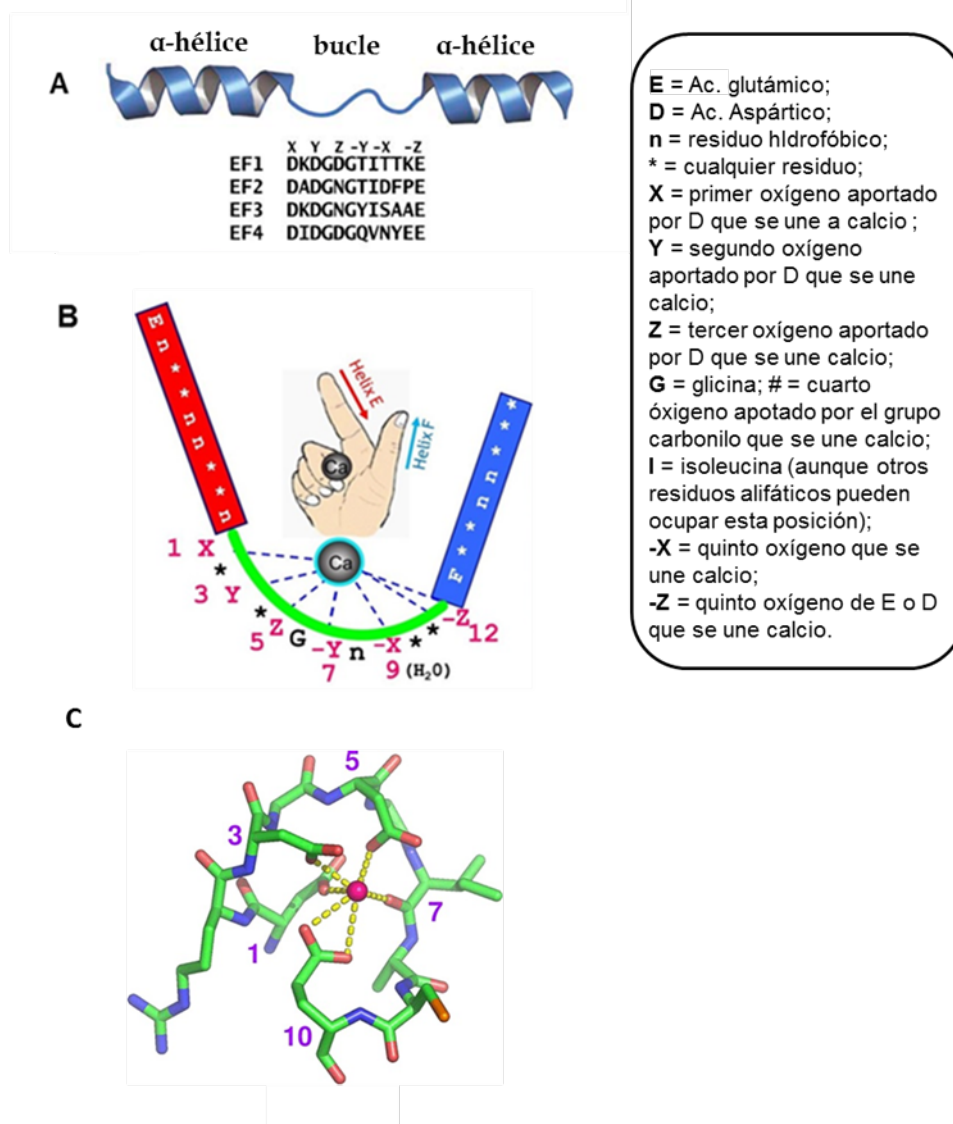


Figura 4. A) Motivo canónico *mano-EF* de la calmodulina basado en dos hélices α separadas por un bucle de 12 aminoácidos. Figura adaptada de Kim et al.⁴¹ B) Representación esquemática de la secuencia consenso del motivo *mano-EF*. En rojo se muestran las posiciones de los aminoácidos que participan en la coordinación con el Ca^{2+} . Fuente : PFAM : PF00036.⁴² C) Representación esquemática de los aminoácidos del bucle que participan en la coordinación con el catión calcio. Figura reproducida de Rigden et al.⁴³

1.2.1.2. Clasificación de los sensores neuronales de calcio

Se han identificado sensores neuronales de calcio en diferentes organismos vivos, que van desde la levadura hasta el humano. En el genoma humano, los NCS están codificados por 14 genes que se agrupan en cinco clases (A-E, Tabla 1): La clase A está constituida por NCS-1/frecuenina, descubierto por primera vez en el género *Drosophila*

melanogaster; La clase B, está formada por hipocalcina, neurocalcina δ y por las proteínas similares a visinilina (VILIPs); Los miembros de las clases C y D son, la recoverina y las proteínas activadoras de la guanilato ciclasa (GCAPs); Y la clase E que está representada por las proteínas que interactúan con los canales de potasio (KChIPs). Mientras que recoverina y GCAPs se expresan únicamente en la retina, los otros NCS presentan diferentes grados de expresión en distintas partes del cerebro, estableciéndose que ciertas neuronas expresan varias o todas las clases de NCS.⁴⁵ Diversos estudios genéticos han mostrado que cada NCS tiene funciones esenciales que no pueden ser compensadas por otros miembros de la familia.^{36b} Existen varios factores que establecen la especificidad de función de cada NCS y explican el porqué de la diversidad en esta familia de proteínas. Estos factores determinan las diferencias entre los distintos miembros de la familia de NCS en su afinidad por Ca^{2+} , en su localización celular, en su dinámica celular, en su expresión celular y en sus interacciones proteína-proteína. El trabajo que se recoge en esta Memoria se centra concretamente en la familia de las proteínas KChIPs.

Tabla 1. Clasificación y función de los sensores neuronales de calcio

| Clase | Proteína | Clase | Proteína |
|-------|-----------------------|-------|----------|
| A | NCS-1 | D | GCAP1 |
| B | Hipocalcina | D | GCAP2 |
| B | Neurocalcina δ | D | GCAP3 |
| B | VILIP-1 | E | KChIP1 |
| B | VILIP-2 | E | KChIP2 |
| B | VILIP-3 | E | KChIP3 |
| C | Recoverina | E | KChIP4 |

1.2.2. Familia de las KChIPs

En el año 2000, un estudio de doble híbrido orientado a la búsqueda de proteínas capaces de unirse a los canales de potasio K_v4 , identificó las primeras subunidades reguladoras de dichos canales, que se denominaron KChIPs.⁴⁶ Estas proteínas no sólo regulan las propiedades biofísicas de la corriente generada por estos canales, sino que también modifican su distribución celular y su densidad dentro de la membrana

plasmática, siendo necesarias para reproducir las características electrofisiológicas de los canales nativos.⁴⁷

1.2.2.1. Clasificación y localización celular de las KChIPs

Al igual que el resto de los miembros de la superfamilia de los NCS, las KChIPs presentan una estructura basada en *manos-EF* y un extremo *N*-terminal muy variable.⁴⁶ La familia de las KChIPs está constituida por cuatro miembros KChIP1-4 con una similitud de secuencia del 70% en el extremo C-terminal. Como se muestra en la Figura 5.A, los genes *KCNIPs 1-4* codifican para diecisiete isoformas de KChIPs, de las cuales, solo KChIP4 se expresa exclusivamente en el cerebro. El resto de las isoformas además de encontrarse en el cerebro, también pueden localizarse en otros tejidos como el corazón, la lengua, los riñones y los testículos.⁴⁸ Por otra parte, aunque la localización natural de las KChIPs es citosólica, la variabilidad en el extremo *N*-terminal juega un papel importante en el control de la localización celular a través de la incorporación de distintos motivos estructurales. Entre las distintas modificaciones postraduccionales de las KChIPs cabe destacar la *N*-miristoilación, la *S*-palmitoilación o la presencia de dominios *N*-transmembrana (Figura 5).⁴⁹ Tanto la miristoilación como la palmitoilación son las formas más comunes de acilación de proteínas, que inducen a las distintas isoformas de las KChIPs a asociarse a la membrana. En la Figura 5.B, se recogen las distintas localizaciones de cada una de las isoformas de KChIPs. KChIP2c, KChIP4b y KChIP4c no contienen ningún elemento estructural que les permita asociarse a la membrana, por lo que estas proteínas están localizadas en el citosol. En cambio, la miristoilación del extremo *N*-terminal de KChIP1a y KChIP1b o la palmitoilación de varias de las isoformas de KChIP1-4 hace que estas proteínas se asocien bien a vesículas transportadoras del retículo endoplasmático o al aparato de Golgi (KChIP1a y KChIP1b), o a la membrana plasmática (resto de las isoformas de KChIPs).^{48d, 49-50} Independientemente del tipo de modificación post-traducciona, la acilación del extremo *N*-terminal tiene importantes consecuencias en el tráfico de canales de potasio Kv4, bien desde las estructuras vesiculares o desde el citosol. Además de la *N*-miristoilación y *S*-palmitoilación, algunas isoformas de KChIPs, como KChIP2x, KChIP3x, KChIP4a y KChIP4e, contienen un dominio transmembrana capaz de modular tanto la expresión como la apertura y cierre de los canales de potasio Kv4.^{48d, 51} Como consecuencia de todo ello, los distintos modos de acilación o la presencia de dominios transmembrana hacen que las KChIPs respondan a las señales de calcio a distintas escalas, tiempos y en diferentes localizaciones.

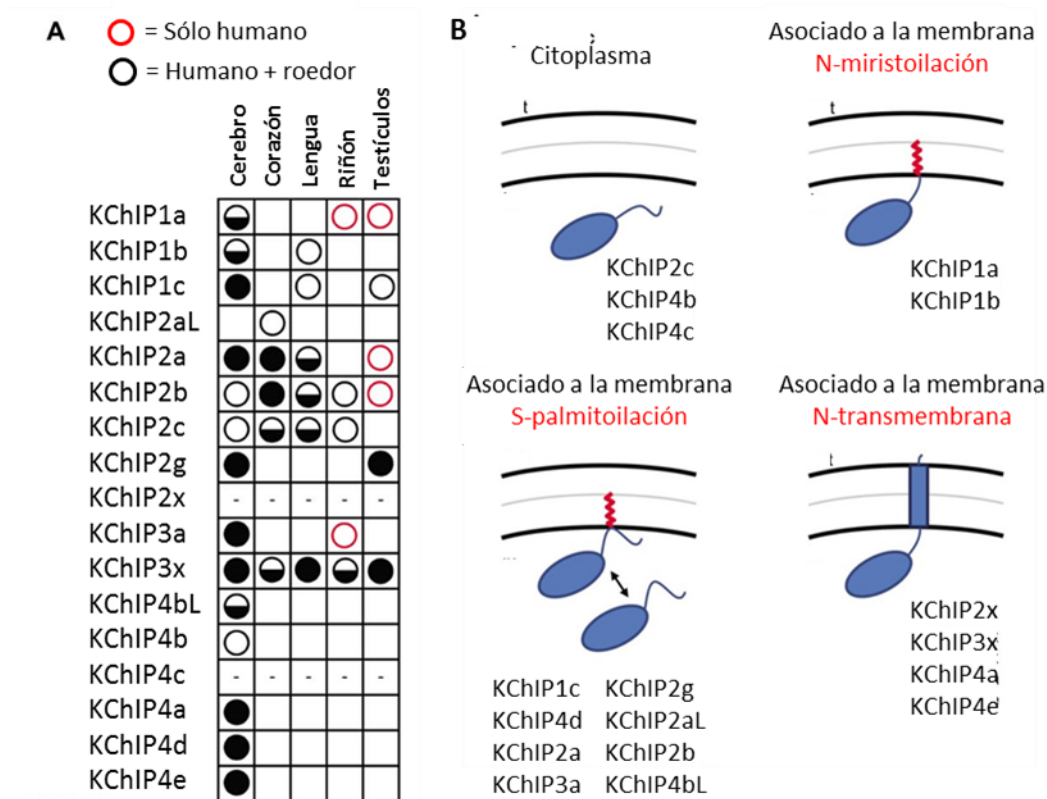


Figura 5. A) Clasificación y expresión de las KChIPs en humanos (rojo y negro) y en roedores (negro). A medida que el nivel de expresión es mayor, los círculos se van rellenando. B) Localización subcelular de las KChIPs. Figura adaptada de Jerg et al.^{48d}

1.2.2.2. Los canales de potasio *Kv4* y las subunidades auxiliares *KChIPs*

De manera general, los canales iónicos son proteínas transmembrana que controlan la permeabilidad de los iones a través de la membrana celular mediante la transición entre distintos estados conformacionales. Entre los distintos estados que puede adoptar un canal iónico se encuentra un estado abierto y dos no conductores, uno cerrado y el otro inactivo (Anexo 1). Dependiendo del estímulo que promueva el tránsito entre los diferentes estados se habla de canales dependientes de voltaje K_v (el proceso de apertura y cierre depende del voltaje de reposo), activados por ligando (depende de la unión de hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (proceso regulado por el Ca^{2+} u otros factores intracelulares).

Cuando los canales activados por voltaje se abren, se produce un movimiento neto de cargas que da lugar a una corriente eléctrica. La medición de esta corriente eléctrica, permite estudiar las características electrofisiológicas (activación, inactivación y recuperación de la inactivación) de cada tipo de canal iónico. De una manera sencilla,

en un modelo de dos compuertas, la activación es el proceso de apertura de la compuerta de activación que ocurre cuando el voltaje dentro de la membrana (potencial de membrana) se vuelve más positivo (despolarización) lo que permitirá registrar un aumento de corriente con respecto a la corriente registrada en el estado cerrado. La inactivación es el cierre de la compuerta de inactivación y al igual que en la activación, ocurre a potenciales despolarizantes. La recuperación de la inactivación o remobilización de la carga es la apertura de la compuerta de inactivación, es decir, el proceso inverso a la inactivación.

El primer canal de potasio dependiente de voltaje K_v que se clonó fue el canal *Shaker* de *Drosophila*, denominado así porque se detectó en una cepa de *Drosophila* que tiemblan cuando se duermen con éter.⁵² A partir de la secuencia de *Shaker* se identificaron tres genes, que codificaban para canales dependientes de voltaje K_v . A estos genes se les denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*.⁵³ Posteriormente, estos genes se identificaron en varios mamíferos (humanos, rata y ratón) y se denominaron K_v1 el *Shaker*, K_v2 el *Shab*, K_v3 el *Shaw* y K_v4 el *Shal*.⁵⁴ Esta Memoria se centra en el canal K_v4 .

La familia de canales K_v4 está constituida por tres genes, $K_v4.1$, $K_v4.2$ y $K_v4.3$, que se encuentran altamente expresados en cerebro, corazón y músculo liso. Los canales K_v4 juegan un papel clave en la excitabilidad neuronal, ya que, junto con otros canales, son los responsables de la repolarización de la membrana neuronal, tras el disparo de un potencial de acción e intervienen en la definición de la propagación unidireccional de los potenciales de acción. Así, cuando se produce una despolarización prolongada de la membrana, los canales dependientes de voltaje K_v4 restringen el movimiento de iones hacia el exterior mediante el proceso de inactivación. La rapidez con la que se reduce el flujo de potasio de salida hace que la corriente generada por estos canales se denomine transitoria o tipo A.⁵⁵ En función del tipo de célula excitable donde tiene lugar la inactivación, se habla de una corriente transitoria I_{TO} (en el corazón) o I_{SA} (en neuronas). Por lo tanto, las alteraciones de los genes que codifican los canales K_v4 o alteraciones en la expresión de estos canales, provocan estados de hiperexcitabilidad celular que están asociados al desarrollo de epilepsias, patologías cardíacas y/o problemas de aprendizaje y memoria.

A nivel del sistema nervioso, la corriente I_{SA} regula la frecuencia de disparo neuronal, la iniciación y la morfología del potencial de acción nervioso, estando implicada en funciones especializadas como el aprendizaje, la memoria y el comportamiento. Por lo tanto, y centrándonos en el canal $K_v4.3$, la modulación farmacológica de este canal representa una diana potencial para el tratamiento de

patologías del sistema nervioso central tales como epilepsia, demencia, ansiedad y dolor, entre otras.

En cuanto a las características cinéticas, cabe destacar que los canales K_v4 operan por debajo del umbral de los potenciales de membrana (-70 mV en neuronas y -85 mV en el corazón) presentando una cinética rápida de activación, de inactivación y de recuperación de la inactivación.⁵⁶ La expresión de los canales K_v4 *in cellulo* da lugar a una corriente de potasio con unas características cinéticas distintas a las que presenta la corriente tipo A (I_{SA} o I_{TO}).^{48d, 57} Esto parece indicar que la situación nativa, sólo es reproducible si se encuentran presentes otras subunidades reguladoras, como las KChIPs, que coexpresan con los canales K_v4 . De forma general, la coexpresión de las proteínas KChIPs con los canales $K_v4.x$ incrementa la expresión de dichos canales en la membrana celular,^{48d, 58} retrasa la inactivación de la corriente y acelera la recuperación de la inactivación.^{48d, 58-59} A pesar de obtener unas características cinéticas más cercanas a la nativa, la coexpresión de la subunidad KChIP y K_v4 no permitía reproducir completamente la corriente tipo A.^{48d} Tras el descubrimiento de las KChIPs, la búsqueda de otras subunidades reguladoras dio paso a la identificación de las proteínas dipeptidil peptidasas (DPPs). DPP6 y DPP10 se caracterizan por interactuar con los canales K_v4 aumentando la expresión en la superficie celular de los mismos, acelerando la activación, inactivación y recuperación de la inactivación del canal.^{48d, 60} Con el fin de reproducir las corrientes nativas de los canales K_v4 , diversos grupos de investigación han sugerido la formación de un complejo macromolecular entre las subunidades reguladoras KChIPs, el extremo N-terminal de DPPs y el extremo N-terminal de K_v4 .^{48d, 60a, 61} Aunque hoy en día se desconocen con detalle las características estructurales de dicho macrocomplejo, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios que han revelado la estructura del complejo entre los canales K_v4 y alguna de las KChIPs, concretamente de KChIP1 y KChIP4.⁶² Las características estructurales del complejo $K_v4.3/KChIP1$, se comentarán de forma detallada en el Capítulo 2 de esta Memoria. Las propiedades electrofisiológicas del canal K_v4 y la modulación de las mismas por las proteínas KChIPs se detallan en el Anexo 1 de esta Memoria.

1.2.3. KChIP3/DREAM/calsenilina

Dentro de la familia de las KChIPs, el trabajo descrito en esta Memoria se ha centrado en la proteína KChIP3. La búsqueda de la secuencia de KChIP3 en la base de datos pública cDNA, reveló que ésta coincidía exactamente con la secuencia de dos

proteínas que ya habían sido identificadas previamente, DREAM (*Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator*)⁶³ y calsenilina.⁶⁴ Utilizando el cADN completo de ratón y el locus del gen, se demostró que las tres proteínas estaban codificadas por un mismo y único gen.⁶⁵ Por lo tanto, KChIP3/DREAM/calsenilina es la misma proteína, identificada de manera independiente por tres grupos de investigación y a la que se le asignaron tres funciones diferentes, las cuales eran específicas de la localización celular. Así, en el año 1998, Buxbaum y col. identificaron a calsenilina y describieron su función en el retículo endoplásmico donde interviene en el metabolismo del péptido β -amiloide a través de su interacción con las presenilinas (PS).⁶⁴ En el año 1999, Naranjo y col. identificaron a DREAM y describieron su función en el núcleo actuando como represor transcripcional de diversos genes a través de su unión a sitios DRE (*Downstream Regulatory Element*), presentes en el promotor de algunos genes.⁶³ En el año 2000, Rhodes y col. identificaron a KChIP3 y describieron su función en la membrana plasmática, donde modula la expresión, la apertura y el cierre de los canales de potasio Kv4.⁴⁶

Estos estudios ponen de manifiesto el papel multifuncional de esta proteína, con acciones específicas en diferentes compartimentos celulares. En esta Memoria nos referiremos a ella como DREAM.

Desde el descubrimiento de DREAM hasta el comienzo de esta Tesis, los estudios realizados sobre esta proteína se centraron fundamentalmente en el descubrimiento de la red de interacciones proteína-proteína en la cual participa, y en la elucidación de su estructura 3D. De hecho, en la literatura sólo había descrito tres moléculas como ligandos de alguna de las proteínas de la familia de los NCS,⁶⁶ información que se detalla en el Capítulo 1 de esta Memoria. Por otra parte, los estudios de la estructura 3D de DREAM se recogen en el Capítulo 2.

1.2.3.1 *El interactoma de DREAM*

En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes estudios que han permitido la identificación de la red de interacciones proteína-proteína (PPIs) en las que DREAM participa.⁶⁷ Estos estudios han puesto de relieve un papel multifuncional de DREAM, con acciones específicas en diferentes compartimentos celulares. En la Figura 8, se detalla el mapa de PPIs de DREAM, indicándose en cada caso donde ocurre la interacción y su dependencia de calcio. Como ejemplos representativos de interacciones no dependientes de calcio destaca, la interacción de DREAM con las presenilinas (PS) en el citosol,⁶⁴ con el factor de transcripción nuclear TTF-1 en el

núcleo,⁶⁸ con el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR) y la cardiotoxina III de la cobra de Taiwán (CTX3) en la membrana plasmática,⁶⁹⁻⁷⁰ con los canales de potasio dependientes de voltaje Kv4 en el retículo endoplásmico,⁴⁶ con el corepresor transcripcional CtBP en las vesículas sinápticas⁷¹ y con la β -1,3 galactosiltransferasa (GalT2) en el aparato de Golgi.⁷²

De la misma manera, se han identificado multitud de interacciones calcio dependientes en las que DREAM está implicada. Entre ellas cabe destacar la interacción con CREM o CREB en el núcleo,⁷³ con las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK2 y GRK6),⁷⁴ el enzima de conjugación Ubc9⁷⁵ y la proteína de andamiaje PSD95⁷⁶ en el citosol, con los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T y L (Cav tipo T y L)⁷⁷ y la subunidad NR1 del receptor N-metil-D-aspartato (NMDR1)⁷⁸ en la membrana plasmática, así como con la hexoquinasa I (HXK1).⁷⁹ Recientemente, se ha descrito una nueva interacción dependiente de calcio entre DREAM y el factor de transcripción ATF6 en el citoplasma.⁸⁰

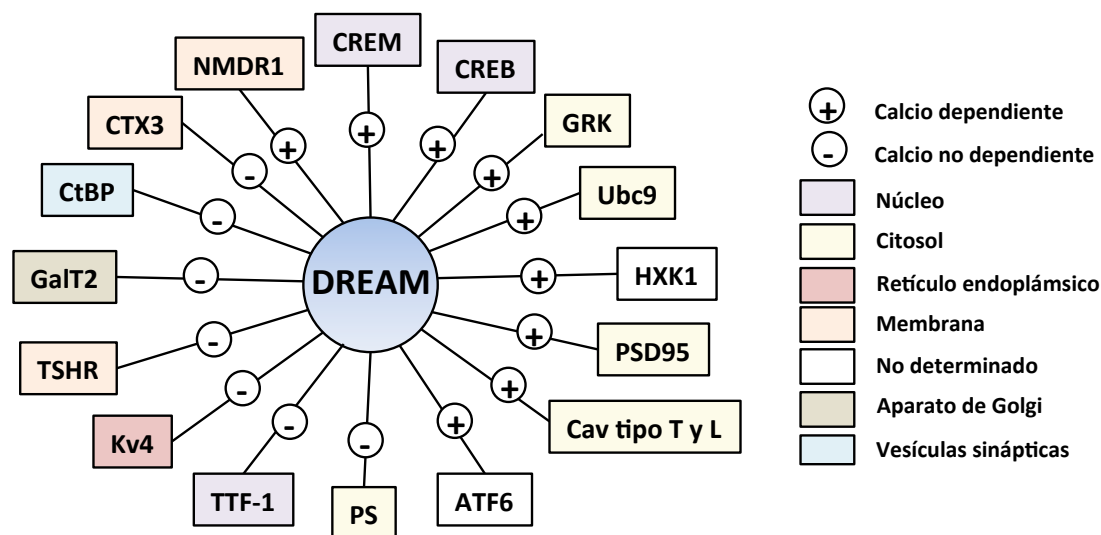


Figura 8. Interactoma de DREAM

El análisis del interactoma de DREAM, sugiere que esta proteína tiene un papel fundamental y relevante, tanto en la fisiología celular como en estados patológicos, a través de interacciones específicas con otras proteínas en diferentes compartimentos subcelulares y tipos de células. A continuación se detallan los ejemplos más representativos de PPIs asociadas a aspectos tan importantes como la funcionalidad y/o su implicación en diferentes enfermedades.

- NMDR1/DREAM: Los NMDRs son receptores ionotrópicos con un papel importante en la plasticidad sináptica. Sin embargo, el gran interés por este tipo de receptores radica en la permeabilidad que presentan por el ión calcio. En muchos trastornos neurológicos como en la isquemia, la epilepsia, en las enfermedades neurodegenerativas o en los desórdenes mentales, el daño neuronal está mediado por la activación excesiva de receptores NMDRs a través del glutamato.⁸¹ Como consecuencia, durante mucho tiempo se ha considerado a los NMDRs como dianas terapéuticas claves para el tratamiento neuronal asociado a una lesión excitotóxica. A pesar de que se han desarrollado multitud de antagonistas para este tipo de receptores, los resultados han sido decepcionantes debido, en gran parte, al gran número de efectos secundarios observados, relacionados con la pérdida de funciones fisiológicas. Por tanto, la búsqueda de proteínas reguladoras de NMDRs podría representar un nuevo enfoque para tratar el daño neuronal. Estudios recientes han revelado que la proteína DREAM es un nuevo regulador de los NMDRs capaz de inhibir la lesión excitotóxica.⁷⁸ Estos resultados indican un nuevo papel de DREAM en el aprendizaje y la memoria.^{78, 82}
- CREB/DREAM: CREB (proteína ligadora del elemento de respuesta AMPc) es una proteína que media la transcripción de diversos genes diana.⁸³ Concretamente, CREB actúa como modulador de la plasticidad sináptica que determina el umbral de estimulación para la memoria a largo plazo. De hecho, cuando se produce un incremento controlado de CREB en el hipocampo aumenta el fenómeno de potenciación sináptica a largo plazo, LTP, el sustrato físico de la memoria.⁸⁴ Por su parte, se ha demostrado que DREAM es un modulador negativo de CREB es decir, que la pérdida de DREAM facilita la transcripción de diversos genes dependientes de CREB, y por tanto, mejora los procesos de aprendizaje y memoria.^{82b}
- Cav tipo T/DREAM: Los Cav tipo T son canales de calcio activados por voltaje de bajo umbral, lo que significa que operan bajo el mismo rango que los canales K_v4. Un estudio desarrollado por Anderson *et al.* ha demostrado que DREAM forma un complejo de señalización con K_v4 y los canales dependientes del voltaje tipo T (Cav3).^{77a, 85} Los resultados electrofisiológicos indican que los canales tipo T canalizan la unión de calcio a DREAM para modular la función K_v4.^{77a}
- Cav tipo L/DREAM: Los Cav tipo L son los canales de calcio mejor estudiados. A diferencia de los de tipo T, éstos operan a voltajes más altos. Estudios recientes indican que DREAM regula la expresión de los Cav tipo L a través de la calmodulina quinasa II (CaMKII). En situaciones patológicas en las que el calcio

intracelular se eleva constantemente, los niveles de expresión del canal Cav tipo L disminuyen a través de la cascada de señalización en la que DREAM participa. Como consecuencia, se suceden una serie de cambios en los niveles del calcio y en la configuración del potencial de acción que conducen a distintas patologías cardíacas.⁸⁶

- PS/DREAM: Las presenilinas (PS) son proteínas transmembrana originalmente identificadas en estudios genéticos de familias con la forma autosómica dominante de la enfermedad de Alzheimer (EA). En mamíferos, la familia de PS consta de dos proteínas homólogas, PS1 y PS2. A nivel celular, las PS forman parte del complejo γ -secretasa. Este complejo, con actividad aspartil-proteasa, tiene como función fragmentar proteínas integrales de membrana tipo 1, como por ejemplo la proteína precursora β -amiloide (APP).⁸⁷ En condiciones normales, la γ -secretasa escinde la APP dando lugar a un péptido soluble que se elimina de la célula con facilidad. Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer, la escisión que opera es primeramente por la β -secretasa y a continuación por la γ -secretasa, dando lugar a un péptido β -amiloide (β A) insoluble que se deposita extracelularmente (placas neuríticas). En el año 1998, Buxbaum y col. definieron la interacción de DREAM con las PS.⁶⁴ Aunque no se conoce muy bien el papel y mecanismo de acción de DREAM en la enfermedad de Alzheimer, diversos autores han sugerido que su función es regular el procesamiento proteolítico de PS1 y PS2 y modular la apoptosis.^{64, 88}
- TSHR/DREAM: El receptor de TSH (TSHR), es un miembro de la superfamilia de receptores de membrana acoplados a la proteína $G\alpha$ que actúa como un receptor funcional al activar la adenilciclase en respuesta a la hormona estimulante del tiroides, TSH.⁸⁹ Estudios con ratones transgénicos, han mostrado que DREAM funciona como un ligando intracelular de TSHR, controlando tanto los niveles del receptor como promoviendo el acoplamiento entre TSHR y $G\alpha$.⁶⁹ Actualmente, además de conocerse la importancia funcional de TSHR, también se reconoce su implicación en enfermedades benignas y malignas del tiroides tales como el bocio multinodular, la enfermedad de Graves, el hipotiroidismo autoinmune, el hipertiroidismo no autoinmune, los adenomas tóxicos y el cáncer de tiroides entre otros.⁹⁰ Como consecuencia, DREAM proporciona un nuevo enfoque tanto para el estudio como para el tratamiento de diversas patologías asociadas a la mala regulación de TSHR.⁶⁹

Entre los múltiples ejemplos de interacciones proteína-proteína en los que

DREAM está involucrado, el trabajo descrito en esta Memoria se ha centrado en la interacción de DREAM con los canales de potasio $K_v4.3$ y con ATF6.

1.2.3.2. Implicación de DREAM en la enfermedad de Huntington

Recientemente, distintos estudios han identificado un papel clave de DREAM en la enfermedad de Huntington, mediante el análisis de los niveles de expresión de DREAM en dos modelos transgénicos murinos de la EH (R6/1 y R6/2), en la línea celular STHdhQ^{111/111}, que contiene la proteína huntingtina mutada con 111 repeticiones de glutamina, y en muestras de cerebro de pacientes afectados por la EH (Figura 9).⁸⁰

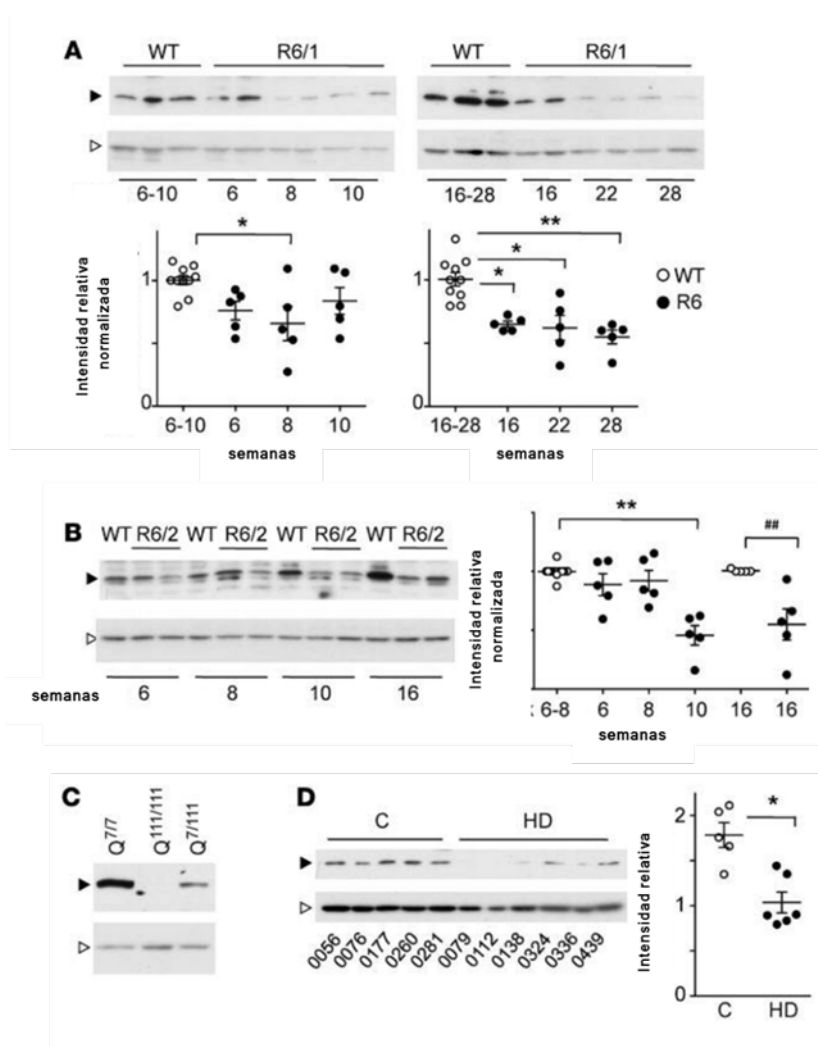


Figura 9. Reducción de la expresión de DREAM *in vivo* e *in vitro* en distintos modelos de EH y pacientes con la EH. Western blot de los niveles de DREAM en el núcleo estriado de ratones R6/1 (A) y R6/2 (B), en la línea celular STHdhQ^{7/111} (C) y en muestras de núcleo estriado de pacientes con la EH (D). Figura adaptada de Naranjo *et al.*⁸⁰

En dichos estudios, se observó que los niveles de expresión de DREAM en el núcleo estriado de ratones R6/1 y R6/2 se redujeron de manera significativa a las 8-9 semanas de edad. Esta reducción coincide con la aparición de la sintomatología motora, pérdida de peso o temblor, en el caso de los ratones R6/2, o mucho antes del comienzo de estas manifestaciones, para los ratones R6/1 (Figura 9.A y 9.B). De la misma manera, se observó una disminución de DREAM en las líneas celulares STHdhQ^{7/111} (Figura 9.C) y en las muestras post mortem de núcleo estriado de pacientes con la EH (Figura 9.D).

Para definir el significado funcional de esta disminución de DREAM, se llevaron a cabo distintos ensayos de coordinación motora en ratones salvajes (WT), R6/2 (RL), heterocigotos deficientes en DREAM endógeno (DR^{+/-}) y en los dobles transgénicos (R6/2 DR^{+/-}). Los resultados del ensayo de coordinación motora (Rota-Rod, Figura 10.A), mostraron que mientras la coordinación motora empeoraba en los ratones R6/2 a las 11 y 16 semanas de vida, en los heterocigotos deficientes de DREAM endógeno (DR^{+/-}) y en los dobles transgénicos, el inicio en la pérdida de la coordinación fue más tardío y menos pronunciado. El análisis del tiempo de supervivencia de R6/2, R6/2-DREAM^{+/-} y el dominante activo (daDREAM), mostró que un aumento del tiempo de vida tenía lugar sólo en aquellos casos en los que los niveles de DREAM eran menores (Figura 10.B). Por tanto, parecía lógico pensar que la disminución de los niveles de DREAM supone un mecanismo de neuroprotección endógena en la EH.

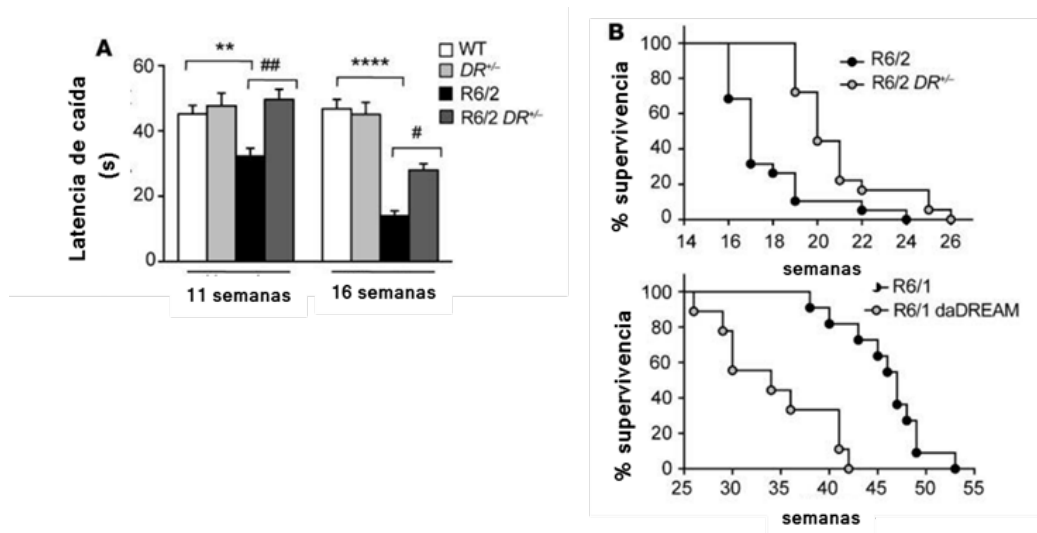


Figura 10. A) Ensayo de coordinación motora en Rota-Rod con ratones salvajes (WT), R6/2, heterocigotos DREAM^{+/-} (DR^{+/-}) y dobles transgénicos R6/2-DREAM^{+/-} (R6/2 DR^{+/-}). B) Análisis del tiempo de supervivencia de ratones R6/2 y del cruce R6/2 con DREAM^{+/-} (R6/2 DR^{+/-}). Figura adaptada de Naranjo et al.⁸⁰

Con el fin de esclarecer el mecanismo que subyace en los fenómenos observados, se evaluó la interacción entre GST-DREAM y el dominio bZIP del factor de transcripción ATF6 mediante la tecnología NAPPA (Nucleic Acid Programmable Protein Array).⁹¹ A partir de estos experimentos se determinó la unión de DREAM con ATF6 de manera calcio dependiente. En condiciones normales DREAM participa en el equilibrio de activación-desactivación de ATF6 y, de alguna manera, también participa en el bloqueo de ATF6 en las neuronas con Huntington. La respuesta de la célula al bloqueo de ATF6 es reducir los niveles de DREAM lo que conlleva un incremento de ATF6 activa. Por lo tanto, moléculas que inhiban DREAM podrían presentar un efecto similar sobre ATF6, estableciéndose una nueva vía para la identificación de compuestos como potenciales fármacos para el tratamiento de la EH.

Por otra parte, se ha establecido un papel clave de DREAM en procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje.^{82b,92} Como se ha comentado anteriormente, el déficit de aprendizaje y el de memoria son los primeros síntomas clínicos de la enfermedad de Huntington y aparecen en los pacientes mucho antes que los síntomas motores.⁹³ Además, en la mayoría de los casos, un incremento en los niveles de calcio en las células post-sinápticas origina un cambio en la eficacia sináptica, por lo que los NCS se establecen como dianas de gran interés para estudiar la plasticidad sináptica y la memoria. Los mecanismos mediante los cuales DREAM regula dichos procesos son muy variados y dependen de la red de interacciones proteína-proteína en la que participa, incluyendo, entre otros, la regulación transcripcional.⁹⁴ También, se ha descrito la importancia de la interacción de DREAM con el canal de potasio Kv4.3 en los procesos de aprendizaje y memoria. DREAM y Kv4 se expresan fundamentalmente en el hipocampo, un área del cerebro importante para el aprendizaje y la memoria.^{82a, 95} Como se ha comentado en apartados anteriores, el canal de potasio Kv4.3, participa en las principales corrientes dendríticas tipo A, las cuales regulan de forma crítica la propagación del potencial de acción y la inducción de formas específicas de plasticidad sináptica.⁹⁶ Además, se ha descrito un aumento de la memoria a largo plazo en ratones que no expresan DREAM, lo que está relacionado con una disminución de la corriente de tipo A generada por los canales Kv4.⁹⁵

Se puede concluir que, dada la importancia de la interacción de DREAM con ATF6 y Kv4.3 en la enfermedad de Huntington, la modulación de esta proteína podría abrir nuevas vías para la búsqueda de tratamientos eficaces para esta enfermedad.

2. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue la búsqueda de nuevas entidades moleculares como herramientas farmacológicas para estudiar la red de interacciones proteína-proteína de DREAM, centrándonos en su interacción con el canal de potasio Kv4.3 y con el factor de transcripción ATF6. En el marco de una colaboración con los grupos del Prof. Naranjo (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC) y la Dra. Valenzuela (Instituto de Investigaciones Biomédica “Alberto Sols”, CSIC-UAM), estas nuevas entidades moleculares podrían contribuir a la validación de DREAM como nueva diana terapéutica para la búsqueda de fármacos útiles en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Para la consecución de este objetivo general, se han utilizado dos estrategias químico-médicas. La primera, toma como punto de partida la estructura de ligandos conocidos de sensores neuronales de calcio homólogos de DREAM, mientras que, la segunda se basa en el estudio de la estructura tridimensional de esta diana. Los resultados de cada una de estas dos aproximaciones conforman, respectivamente, el Capítulo 1 y 2 de la presente Memoria.

El primer capítulo se centra en la identificación de nuevos ligandos de DREAM a partir de la estructura de compuestos conocidos que interaccionan con otros sensores neuronales de calcio. Como primer objetivo se planteó la búsqueda de un cabeza de serie y su posterior optimización. En segundo lugar, con el fin de establecer los requisitos mínimos estructurales necesarios para la unión a DREAM, se abordó el análisis de las relaciones estructura-actividad. Finalmente, en una primera aproximación al estudio del interactoma de DREAM, se propuso, evaluar la capacidad de los ligandos obtenidos para modular la interacción Kv4.3/DREAM.

El segundo capítulo se centra en la búsqueda de nuevos ligandos de DREAM utilizando métodos computacionales basados en su estructura 3D. Como primer objetivo se planteó el diseño y la selección de potenciales ligandos de DREAM

mediante estudios de docking molecular, así como su síntesis y la evaluación de su afinidad por DREAM. Además, como segundo objetivo, se abordó la validación experimental del sitio de unión propuesto por los estudios teóricos. Como tercer objetivo, se contempló el estudio del efecto de la modulación de los ligandos en las interacciones Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM. Finalmente, se planteó la evaluación *in vivo* de los ligandos más prometedores en un modelo transgénico murino de la enfermedad de Huntington.

Los objetivos generales y específicos de la presente Memoria se recogen esquemáticamente en la Figura 11.



Figura 11. Objetivos generales y específicos de esta Tesis Doctoral

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Arbor A, D. J. R., George Huntington (1850-1916). In *The Founders of Neurology*, 2^a ed.; Springfield, I., Ed. Charles C. Thomas: **1970**; 453-456.
2. MacDonald, E.; Ambrose, M.; Duyao, P.; Myers, H.; Lin, Srinidhi. C.; Barnes. L.; Taylo. G.; Sherryl, A. J.; Groot, M.; MacFarlane, N.; Jenkins, H.; Anderson, B.; Wexler, M.A.; Gusella, N.; Bates, J.; Baxendale, G.; Hummerich, S.; Kirby, H.; North, S.; Youngman, M.; Mott, S.; Zehetner, R.; Sedlacek, G.; Poustka, Z.; Frischauf, A.; Lehrach, A.M.; Buckler, H.; Church, A.J.; Doucette-Stamm, D.; O'Donovan, L.; Riba-Ramirez, M.C.; Shah, L.; Stanton, M.; Strobel, V.C.; Draths, S.A.; Wales K.M.; Dervan, J.L.; Housman, P.; Altherr, D.E.; Shiang, M.; Thompson, R.; Fielder, L.; Wasmuth, T.; Tagle, J.J.; Valdes, D.; Elmer, J.; Allard L.; Castilla, M.; Swaroop, L.; Blanchard, M.; Collins, K.; Snell, F.S.; Holloway, R.; Gillespie, T.; Datson, K.; Shaw, N.; Harper, D.; Peter S. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **1993**, 72, 971-983.
3. Perez-Navarro, E.; Canudas, A. M.; Akerud, P.; Alberch, J.; Arenas, E. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* **2000**, 75, 2190-2199.
4. (a) Pringsheim, T.; Wiltshire, K.; Day, L.; Dykeman, J.; Steeves, T.; Jette, N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **2012**, 27, 1083-1091; (b) Schapira, A. H. V.; Olanow, C. W.; Greenamyre, J. T.; Bezdard, E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* **2014**, 384, 545-555; (c) Rawlins, M. D.; Wexler, N. S.; Wexler, A. R.; Tabrizi, S. J.; Douglas, I.; Evans, S. J. W.; Smeeth, L. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology* **2016**, 46, 144-53; (d) Biglan, K. M.; Shoulson, I. Huntington's disease. In *Therapeutics of Parkinson's Disease and Other Movement Disorders*, Sons, J. W., Ed. Hallett, M. Poewe, W.: **1998**; (e) http://www.cmmmt.ubc.ca/research/diseases/huntingtons/HD_Prevalence. (accessed Nov 21/2016).
5. Myers, R. H. Huntington's Disease Genetics. *NeuroRx* **2004**, 1, 255-262.
6. (a) Potter, N. T.; Spector, E. B.; Prior, T. W. Technical standards and guidelines for Huntington disease testing. *Genet. Med.* **2004**, 6, 61-65; (b) Azzarelli, A. Enfermedad

de Huntington y degeneraciones de algunos núcleos subcorticales. In Neuropatología, diagnóstico y clínica. Edisma, Ed. **2000**; 603-620; (c) Potter, N. T.; Spector, E.B.; Prior, T.W.; Ropper, A.H.; Samuels, A. Degenerative Diseases of the Nervous System. In Adams & Victor's Principles of Neurology, 9 ed.; McGraw-Hill: **2009**; 895-954.

7. (a) Hersch, S. M.; Rosas, H. D. Neuroprotection for Huntington's disease: ready, set, slow. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 226-236; (b) Mestre, T.; Ferreira, J.; Coelho, M. M.; Rosa, M.; Sampaio, C. Therapeutic interventions for disease progression in Huntington's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, CD006455.

8. (a) Savani, A. A.; Login, I. S. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology* **2007**, *68* (10), 797 (b) Adam, O. R.; Jankovic, J. Symptomatic treatment of Huntington disease. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 181-197.

9. Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **2004**, (Suppl.), S10-S17.

10. (a) Kirkitadze, M. D.; Bitan, G.; Teplow, D. B. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J. Neurosci. Res.* **2002**, *69*, 567-577; (b) Treusch, S.; Cyr, D. M.; Lindquist, S. Amyloid deposits: Protection against toxic protein species? *Cell. Cycle* **2009**, *8*, 1668-1674; (c) Chen, X.; Burgoyne, R. D. Identification of common genetic modifiers of neurodegenerative diseases from an integrative analysis of diverse genetic screens in model organisms. *BMC Genomics* **2012**, *13*, 71; (d) Voisine, C.; Pedersen, J. S.; Morimoto, R. I. Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *40*, 12-20.

11. (a) Katayama, T.; Imaizumi, K.; Honda, A.; Yoneda, T.; Kudo, T.; Takeda, M.; Mori, K.; Rozmahel, R.; Fraser, P.; St. George-Hyslop, P.; Tohyama, M. Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43446-43454; (b) Egawa, N.; Yamamoto, K.; Inoue, H.; Hikawa, R.; Nishi, K.; Mori, K.; Takahashi, R. The Endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7947-7957.

12. Vembar, S. S.; Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 944-957.

13. Frand, A. R.; Cuozzo, J. W.; Kaiser, C. A. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends. Cell. Biol.* **2000**, *10*, 203-210.

14. (a) Ma, Y.; Hendershot, L. M. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 966-77; (b) Zhao, G.; Blackstone, C., ER Morphology: Sculpting with XendoU. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R1170-R1172.

15. Ron, D.; Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 519-529.

16. (a) Loayza, D.; Tam, A.; Schmidt, W. K.; Michaelis, S. Step mutants defective in exit from the endoplasmic reticulum (ER) reveal aspects of an ER quality control pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **1998**, *9*, 2767-2784; (b) Kostova, Z.;

Wolf, D. H. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2309-2317; (c) Ahner, A.; Brodsky, J. L. Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 474-478.

17. (a) Schroeder, M.; Kaufman, R. J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *569*, 29-63; (b) Schroeder, M.; Kaufman, R. J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 739-789; (c) Travers, K. J.; Patil, C. K.; Wodicka, L.; Lockhart, D. J.; Weissman, J. S.; Walter, P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **2000**, *101*, 249-258.

18. (a) Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L. M.; Harding, H. P.; Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 326-332; (b) Ma, K.; Vatter, K. M.; Wek, R. C. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18728-18735; (c) Shen, J.; Chen, X.; Hendershot, L.; Prywes, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 99-111; (d) Wang, S.; Kaufman, R. J. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell. Biol.* **2012**, *197*, 857-867; (e) Hetz, C.; Mollereau, B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 233-249.

19. (a) Yoshida, H.; Matsui, T.; Yamamoto, A.; Okada, T.; Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **2001**, *107*, 881-891; (b) Lee, A.-H.; Iwakoshi, N. N.; Glimcher, L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 7448-7459; (c) Acosta-Alvear, D.; Zhou, Y.; Blais, A.; Tsikitis, M.; Lents, N. H.; Arias, C.; Lennon, C. J.; Kluger, Y.; Dynlacht, B. D. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 53-66.

20. (a) Shi, Y.; Vatter, K. M.; Sood, R.; An, J.; Liang, J.; Stramm, L.; Wek, R. C. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 α -subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 7499-7509; (b) Scheuner, D.; Song, B.; McEwen, E.; Liu, C.; Laybutt, R.; Gillespie, P.; Saunders, T.; Bonner-Weir, S.; Kaufman, R. J. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 1165-1176.

21. (a) Harding, H. P.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wek, R.; Schapira, M.; Ron, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1099-1108; (b) Harding, H. P.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Novoa, I.; Lu, P. D.; Calton, M.; Sadri, N.; Yun, C.; Popko, B.; Paules, R.; Stojdl, D. F.; Bell, J. C.; Hettmann, T.; Leiden, J. M.; Ron, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 619-633.

22. Schindler, A. J.; Schekman, R. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 17775-17780, S17775/1-S17775/4.

23. (a) Wu, J.; Rutkowski, D. T.; Dubois, M.; Swathirajan, J.; Saunders, T.; Wang, J.; Song, B.; Yau, G. D. Y.; Kaufman, R. J. ATF6 α optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev. Cell* **2007**, *13*, 351-64; (b) Yamamoto, K.; Takahara, K.; Oyadomari, S.; Okada, T.; Sato, T.; Harada, A.; Mori, K. Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6 α -knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 2975-2986.
24. Fernandez-Fernandez, M. R.; Ferrer, I.; Lucas, J. J. Impaired ATF6 α processing, decreased Rheb and neuronal cell cycle re-entry in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *41*, 23-32.
25. (a) Mattson, M. P.; LaFerla, F. M.; Chan, S. L.; Leissring, M. A.; Shepel, P. N.; Geiger, J. D. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 222-229; (b) Paschen, W.; Frandsen, A. Endoplasmic reticulum dysfunction - a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J. Neurochem.* **2001**, *79*, 719-725.
26. (a) Bezprozvanny, I.; Mattson, M. P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 454-463; (b) Mattson, M. P. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* **2007**, *6*, 337-350; (c) Celsi, F.; Pizzo, P.; Brini, M.; Leo, S.; Fotino, C.; Pinton, P.; Rizzuto, R. Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2009**, *1787*, 335-344; (d) Marambaud, P.; Dreses-Werringloer, U.; Vingtdeux, V. Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **2009**, *4*, 20; (e) Frazier, H. N.; Maimaiti, S.; Anderson, K. L.; Brewer, L. D.; Gant, J. C.; Porter, N. M.; Thibault, O. Calcium's role as nuanced modulator of cellular physiology in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 981-987.
27. (a) Ramaswamy, S.; Shannon, K. M.; Kordower, J. H. Huntington's disease: pathological mechanisms and therapeutic strategies. *Cell Transplant* **2007**, *16*, 301-12; (b) Nakamura, K.; Aminoff, M. J. Huntington's disease: clinical characteristics, pathogenesis and therapies. *Drugs Today* **2007**, *43*, 97-116; (c) Fan, M. M. Y.; Raymond, L. A. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **2007**, *81*, 272-293; (d) Fernandes, H. B.; Raymond, L. A. In NMDA receptors and huntington's disease, CRC Press: **2009**; pp 17-40; (e) Bezprozvanny, I. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, calcium signalling and Huntington's disease. *Subcell Biochem.* **2007**, *45*, 323-35.
28. (a) Prentice, H.; Modi, J. P.; Wu, J.-Y. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2015**, 964518; (b) Kezuka, D.; Tkarada-Iemata, M.; Hattori, T.; Mori, K.; Takahashi, R.; Kitao, Y.; Hori, O. Deletion of Atf6 α enhances kainate-induced neuronal death in mice. *Neurochem. Int.* **2016**, *92*, 67-74; (c) Yap, Y. W.; Llanos, R. M.; La Fontaine, S.; Cater, M. A.; Beart, P. M.; Cheung, N. S. Comparative Microarray Analysis Identifies Commonalities in Neuronal Injury: Evidence for Oxidative Stress, Dysfunction of Calcium Signalling, and Inhibition of Autophagy-Lysosomal Pathway. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 554-567; (d) Van Laar, V. S.; Roy, N.; Liu, A.; Rajprohat, S.; Arnold, B.; Dukes, A. A.; Holbein, C. D.; Berman, S. B. Glutamate excitotoxicity in neurons triggers mitochondrial and

endoplasmic reticulum accumulation of Parkin, and, in the presence of N-acetyl cysteine, mitophagy. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *74*, 180-193.

29. (a) Cattaneo, E.; Rigamonti, D.; Goffredo, D.; Zuccato, C.; Squitieri, F.; Sipione, S. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 182-188; (b) Leavitt, B. R.; van Raamsdonk, J. M.; Shehadeh, J.; Fernandes, H.; Murphy, Z.; Graham, R. K.; Wellington, C. L.; Raymond, L. A.; Hayden, M. R. Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J. Neurochem.* **2006**, *96*, 1121-1129; (c) Zuccato, C.; Tartari, M.; Crotti, A.; Goffredo, D.; Valenza, M.; Conti, L.; Cataudella, T.; Leavitt, B. R.; Hayden, M. R.; Timmusk, T.; Rigamonti, D.; Cattaneo, E. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat. Genet.* **2003**, *35*, 76-83; (d) Mangiarini, L.; Sathasivam, K.; Seller, M.; Cozens, B.; Harper, A.; Hetherington, C.; Lawton, M.; Trotter, Y.; Lehrach, H.; et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **1996**, *87*, 493-506.

30. (a) Schulte, J.; Littleton, J. T. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's disease pathology. *Curr. Trends Neurol.* **2011**, *5*, 65-78; (b) Imarisio, S.; Carmichael, J.; Korolchuk, V.; Chen, C.-W.; Saiki, S.; Rose, C.; Krishna, G.; Davies, J. E.; Tofsi, E.; Underwood, B. R.; Rubinsztein, D. C. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem. J.* **2008**, *412*, 191-209.

31. Hodges, A.; Strand, A. D.; Aragaki, A. K.; Kuhn, A.; Sengstag, T.; Hughes, G.; Elliston, L. A.; Hartog, C.; Goldstein, D. R.; Thu, D.; Hollingsworth, Z. R.; Collin, F.; Synek, B.; Holmans, P. A.; Young, A. B.; Wexler, N. S.; Delorenzi, M.; Kooperberg, C.; Augood, S. J.; Faull, R. L. M.; Olson, J. M.; Jones, L.; Luthi-Carter, R. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 965-977.

32. Schroeder, A. M.; Wang, H. B.; Park, S.; Jordan, M. C.; Gao, F.; Coppola, G.; Fishbein, M. C.; Roos, K. P.; Ghiani, C. A.; Colwell, C. S. Cardiac dysfunction in the BACHD mouse model of Huntington's disease. *PLOS One* **2016**, *11*, e0147269/1-e0147269/25.

33. Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 11-21.

34. (a) Haeseleer, F.; Imanishi, Y.; Sokal, I.; Filipek, S.; Palczewski, K. Calcium-Binding Proteins: Intracellular Sensors from the Calmodulin Superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 615-623; (b) McCue, H. V.; Haynes, L. P.; Burgoyne, R. D. The diversity of calcium sensor proteins in the regulation of neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a004085.

35. (a) Lee, A. In New roles for neuronal calcium sensors. *Am. Chem. Soc.* **2003**, 254; (b) Burgoyne, R. D.; O'Callaghan, D. W.; Hasdemir, B.; Haynes, L. P.; Tepikin, A. V. Neuronal Ca²⁺-sensor proteins: multitasking regulators of neuronal function. *Trends Neurosci.* **2004**, *27*, 203-209.

36. (a) Seaton, G.; Hogg, E. L.; Jo, J.; Whitcomb, D. J.; Cho, K. Sensing change: The emerging role of calcium sensors in neuronal disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*,

- 530-535; (b) Burgoyne, R. D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 182-193.
37. Kretsinger, R. H.; Nockolds, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 3313-26.
38. Gifford, J. L.; Walsh, M. P.; Vogel, H. J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* **2007**, 405, 199-221.
39. Yáñez, M.; Gil-Longo, J.; Campos-Toimil, M.; Yáñez, M.; Gil-Longo, J.; Campos-Toimil, M. In *Calcium Signaling*, Islam, M. S., Ed. Springer Netherlands: **2012**; Vol. 740, 461-482.
40. (a) Rigden, D. J.; Galperin, M. Y. The Dx²DxDG Motif for Calcium Binding: Multiple Structural Contexts and Implications for Evolution. *J. Mol. Biol.* **2004**, 343, 971-984; (b) Rigden, D. J.; Woodhead, D. D.; Wong, P. W. H.; Galperin, M. Y. New structural and functional contexts of the Dx[DN]xDG linear motif: insights into evolution of calcium-binding proteins. *PLoS One* **2011**, 6, e21507.
41. Kim, E. Y.; Findeisen, F.; Minor, D. L. In *Calmodulin interactions with Cav1 and Cav2 voltage-gated calcium channel IQ domains*. John Wiley & Sons Ltd.: **2011**; 773-790.
42. <http://pfam.xfam.org/family/PF00036>. (accessed 30/12/2016).
43. Rigden, D. J.; Jedrzejewski, M. J.; Galperin, M. Y. An extracellular calcium-binding domain in bacteria with a distant relationship to EF-hands. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, 221, 103-110.
44. Ames, J. B.; Lim, S. Molecular structure and target recognition of neuronal calcium sensor proteins. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2012**, 1820, 1205-1213.
45. (a) Paterlini, M.; Revilla, V.; Grant, A. L.; Wisden, W. Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience* **2000**, 99, 205-216; (b) Rhodes, K. J.; Carroll, K. I.; Sung, M. A.; Doliveira, L. C.; Monaghan, M. M.; Burke, S. L.; Strassle, B. W.; Buchwalder, L.; Menegola, M.; Cao, J.; An, W. F.; Trimmer, J. S. KChIPs and Kv4 α subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 7903-7915.
46. An, W. F.; Bowlby, M. R.; Betty, M.; Cao, J.; Ling, H.-P.; Mendoza, G.; Hinson, J. W.; Mattsson, K. I.; Strassle, B. W.; Trimmers, J. S.; Rhodes, K. J. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **2000**, 403, 553-556.
47. Nadal, M. S.; Amarillo, Y.; Vega-Saenz de Miera, E.; Rudy, B. Evidence for the presence of a novel Kv4-mediated A-type K⁺ channel-modifying factor. *J. Physiol.* **2001**, 537, 801-809.
48. (a) Jerng, H. H.; Pfaffinger, P. J.; Covarrubias, M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol. Cell Neurosci.* **2004**, 27, 343-369; (b) Pruunsild, P.; Timmusk, T. Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. *Genomics* **2005**, 86, 581-593; (c) Pongs, O.; Schwarz, J. R. Ancillary subunits associated with voltage-dependent K⁺ channels.

Physiol. Rev. **2010**, 90, 755-796; (d) Jerng, H. H.; Pfaffinger, P. J. Modulatory mechanisms and multiple functions of somatodendritic A-type K⁺ channel auxiliary subunits. *Front. Cell Neurosci.* **2014**, 8, 20.

49. O'Callaghan, D. W.; Hasdemir, B.; Leighton, M.; Burgoyne, R. D. Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca²⁺ sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K⁺ channels. *J. Cell Sci.* **2003**, 116, 4833-4845.

50. Takimoto, K.; Yang, E.-K.; Conforti, L. Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26904-26911.

51. (a) Jerng, H. H.; Pfaffinger, P. J. Multiple Kv Channel-interacting Proteins Contain an N-terminal Transmembrane Domain That Regulates Kv4 Channel Trafficking and Gating. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 36046-36059; (b) Pruunsild, P.; Timmusk, T. Subcellular localization and transcription regulatory potency of KCNIP/Calsenilin/DREAM/KChIP proteins in cultured primary cortical neurons do not provide support for their role in CRE-dependent gene expression. *J. Neurochem.* **2012**, 123, 29-43.

52. Bezanilla, F.; Perozo, E.; Papazian, D. M.; Stefani, E. Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science* **1991**, 254, 679-83.

53. (a) Catterall, W. A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **1988**, 242, 50-61; (b) Kamb, A.; Iverson, L. E.; Tanouye, M. A. Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* **1987**, 50, 405-13.

54. (a) Papazian, D. M.; Schwarz, T. L.; Tempel, B. L.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science* **1987**, 237, 749-53; (b) Pongs, O.; Kecskemethy, N.; Mueller, R.; Krah-Jentgens, I.; Baumann, A.; Kiltz, H. H.; Canal, I.; Llamazares, S.; Ferrus, A. Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. *EMBO J.* **1988**, 7, 1087-96; (c) Butler, A.; Wei, A.; Baker, K.; Salkoff, L. A family of putative potassium channel genes in Drosophila. *Science* **1989**, 243, 943-7; (d) Chandy, K. G.; Gutman, G. A.; Grissmer, S. Physiological role, molecular structure and evolutionary relationships of voltage-gated potassium channels in T lymphocytes. *Semin. Neurosci.* **1993**, 5, 125-134.

55. (a) Deal, K. K.; England, S. K.; Tamkun, M. M. Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol. Rev.* **1996**, 76, 49-67; (b) Snyders, D. J., Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **1999**, 42, 377-390.

56. (a) Litovsky, S. H.; Antzelevitch, C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ. Res.* **1988**, 62, 116-26; (b) Fermi, B.; Wang, Z.; Duan, D.; Nattel, S. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am. J. Physiol.* **1992**, 263, 1747-1754.

57. (a) Serodio, P.; Kentros, C.; Rudy, B. Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *J. Neurophysiol.* **1994**, 72, 1516-1529; (b) Serodio, P.; Vega-Saenz de Miera, E.; Rudy, B. Cloning of a novel component

of A-type K⁺ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J. Neurophysiol.* **1996**, 75, 2174-2179.

58. Bähring, R.; Boland, L. M.; Varghese, A.; Gebauer, M.; Pongs, O. Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *J. Physiol.* **2001**, 535, 65-81.

59. Deschenes, I.; Tomaselli, G. F. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett.* **2002**, 528, 183-188.

60. (a) Nadal, M. S.; Ozaita, A.; Amarillo, Y.; Vega-Saenz de Miera, E.; Ma, Y.; Mo, W.; Goldberg, E. M.; Misumi, Y.; Ikehara, Y.; Neubert, T. A.; Rudy, B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* **2003**, 37, 449-461; (b) Jerng, H. H.; Qian, Y.; Pfaffinger, P. J. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys. J.* **2004**, 87, 2380-2396; (c) Ren, X.; Hayashi, Y.; Yoshimura, N.; Takimoto, K. Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels. *Mol. Cell Neurosci.* **2005**, 29, 320-332; (d) Zagha, E.; Ozaita, A.; Chang, S. Y.; Nadal, M. S.; Lin, U.; Saganich, M. J.; McCormack, T.; Akinsanya, K. O.; Qi, S. Y.; Rudy, B. DPP10 Modulates Kv4-mediated A-type Potassium Channels. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 18853-18861; (e) Maffie, J. K.; Dvoretzskova, E.; Bougis, P. E.; Martin-Eauclaire, M.-F.; Rudy, B. Dipeptidyl-peptidase-like proteins confer high sensitivity to the scorpion toxin AmmTX3 to Kv4-mediated A-type K⁺ channels. *J. Physiol.* **2013**, 591, 2419-2427.

61. Jerng, H. H.; Kunjilwar, K.; Pfaffinger, P. J. Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J. Physiol.* **2005**, 568, 767-788.

62. (a) Wang, H.; Yan, Y.; Liu, Q.; Huang, Y.; Shen, Y.; Chen, L.; Chen, Y.; Yang, Q.; Hao, Q.; Wang, K.; Chai, J. Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat. Neurosci.* **2007**, 10, 32-39; (b) Pioletti, M.; Findeisen, F.; Hura, G. L.; Minor, D. L., Jr. Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13, 987-995; (c) Liang, P.; Wang, H.; Chen, H.; Cui, Y.; Gu, L.; Chai, J.; Wang, K. Structural Insights into KChIP4a Modulation of Kv4.3 Inactivation. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 4960-4967.

63. Carrion, A. M.; Link, W. A.; Ledo, F.; Mellstrom, B.; Naranjo, J. R. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* **1999**, 398, 81-84.

64. Buxbaum, J. D.; Choi, E.-K.; Luo, Y.; Lilliehook, C.; Crowley, A. C.; Merriam, D. E.; Wasco, W. Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat. Med.* **1998**, 4, 1177-1181.

65. Spreafico, F.; Barski, J. J.; Farina, C.; Meyer, M. Mouse DREAM/Calsenilin/KChIP3: gene structure, coding potential, and expression. *Mol. Cell Neurosci.* **2001**, 17, 1-16.

66. (a) Okada, M.; Takezawa, D.; Tachibanaki, S.; Kawamura, S.; Tokumitsu, H.; Kobayashi, R. Neuronal calcium sensor proteins are direct targets of the insulinotropic agent repaglinide. *Biochem. J.* **2003**, 375, 87-97; (b) Bowlby, M. R.; Chanda, P.; Edris, W.; Hinson, J.; Jow, F.; Katz, A. H.; Kennedy, J.; Krishnamurthy, G.; Pitts, K.; Ryan, K.

- Zhang, H.; Greenblatt, L. Identification and characterization of small molecule modulators of KChIP/Kv4 function. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6112-6119; (c) Calloe, K.; Cordeiro, J. M.; Di Diego, J. M.; Hansen, R. S.; Grunnet, M.; Olesen, S. P.; Antzelevitch, C. A transient outward potassium current activator recapitulates the electrocardiographic manifestations of Brugada syndrome. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 686-694.
67. Rivas, M.; Villar, D.; Gonzalez, P.; Dopazo, X. M.; Mellstrom, B.; Naranjo, J. R. Building the DREAM interactome. *Sci. China: Life Sci.* **2011**, *54*, 786-792.
68. Rivas, M.; Mellstroem, B.; Naranjo, J. R.; Santisteban, P. Transcriptional Repressor DREAM Interacts with Thyroid Transcription Factor-1 and Regulates Thyroglobulin Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33114-33122.
69. Rivas, M.; Mellstrom, B.; Torres, B.; Cali, G.; Ferrara, A. M.; Terracciano, D.; Zannini, M.; Morreale de Escobar, G.; Naranjo, J. R. The DREAM protein is associated with thyroid enlargement and nodular development. *Mol. Endocrinol.* **2009**, *23*, 862-870.
70. Lin, Y.-L.; Wu, P.-F.; Wu, T. T.; Chang, L.-S. KChIP3: A binding protein for Taiwan banded krait α -bungarotoxin. *Toxicon* **2006**, *47*, 265-270.
71. Zaidi, N. F.; Kuplast, K. G.; Washicosky, K. J.; Kajiwarra, Y.; Buxbaum, J. D.; Wasco, W. Calsenilin interacts with transcriptional co-repressor C-terminal binding protein(s). *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 1290-1301.
72. Parker, D.; Ferreri, K.; Nakajima, T.; LaMorte, V. J.; Evans, R.; Koerber, S. C.; Hoeger, C.; Montminy, M. R. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 694-703.
73. (a) Ledo, F.; Kremer, L.; Mellstroem, B.; Naranjo, J. R. Ca²⁺-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *EMBO J.* **2002**, *21*, 4583-4592; (b) Ledo, F.; Carrion, A. M.; Link, W. A.; Mellstrom, B.; Naranjo, J. R. DREAM- α CREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 9120-9126.
74. Ruiz-Gomez, A.; Mellstroem, B.; Tornero, D.; Morato, E.; Savignac, M.; Holguin, H.; Aurrekoetxea, K.; Gonzalez, P.; Gonzalez-Garcia, C.; Cena, V.; Mayor, F., Jr.; Naranjo, J. R. G Protein-coupled Receptor Kinase 2-mediated Phosphorylation of Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator Regulates Membrane Trafficking of Kv4.2 Potassium Channel. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1205-1215.
75. Palczewska, M.; Casafont, I.; Ghimire, K.; Rojas, A. M.; Valencia, A.; Lafarga, M.; Mellstroem, B.; Naranjo, J. R. Sumoylation regulates nuclear localization of repressor DREAM. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1050-1058.
76. Wu, L.-J.; Mellstrom, B.; Wang, H.; Ren, M.; Domingo, S.; Kim, S. S.; Li, X.-Y.; Chen, T.; Naranjo, J. R.; Zhuo, M. DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) contributes to synaptic depression and contextual fear memory. *Mol. Brain* **2010**, *3*, 3.
77. (a) Anderson, D.; Mehaffey, W. H.; Iftinca, M.; Rehak, R.; Engbers, J. D. T.; Hameed, S.; Zamponi, G. W.; Turner, R. W. Regulation of neuronal activity by Cav3-

- Kv4 channel signaling complexes. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 333-337; (b) Thomsen, M. B.; Wang, C.; Oezgen, N.; Wang, H.-G.; Rosen, M. R.; Pitt, G. S. Accessory Subunit KChIP2 Modulates the Cardiac L-Type Calcium Current. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 1382-1389.
78. Zhang, Y.; Su, P.; Liang, P.; Liu, T.; Liu, X.; Liu, X.-Y.; Zhang, B.; Han, T.; Zhu, Y.-B.; Yin, D.-M.; Li, J.; Zhou, Z.; Wang, K.-W.; Wang, Y. The DREAM protein negatively regulates the NMDA receptor through interaction with the NR1 subunit. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 7575-7586.
79. Craig, T. A.; Ramachandran, P. L.; Bergen, H. R.; Podratz, J. L.; Windebank, A. J.; Kumar, R. The regulation of apoptosis by the downstream regulatory element antagonist modulator/potassium channel interacting protein 3 (DREAM/KChIP3) through interactions with hexokinase I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *433*, 508-512.
80. Naranjo, J. R.; Zhang, H.; Villar, D.; Gonzalez, P.; Dopazo, X. M.; Moron-Oset, J.; Higuera, E.; Oliveros, J. C.; Arrabal, M. D.; Prieto, A.; Cercos, P.; Gonzalez, T.; De, I. C. A.; Casado-Vela, J.; Rabano, A.; Valenzuela, C.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Li, J.-Y.; Mellstrom, B. Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 627-38.
81. (a) Choi, D. W.; Koh, J. Y.; Peters, S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci.* **1988**, *8*, 185-96; (b) Sattler, R.; Tymianski, M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* **2001**, *24*, 107-129.
82. (a) Alexander, J. C.; McDermott, C. M.; Tunur, T.; Rands, V.; Stelly, C.; Karhson, D.; Bowlby, M. R.; An, W. F.; Sweatt, J. D.; Schrader, L. A. The role of calsenilin/DREAM/KChIP3 in contextual fear conditioning. *Learn Mem.* **2009**, *16*, 167-177; (b) Fontan-Lozano, A.; Romero-Granados, R.; del-Pozo-Martin, Y.; Suarez-Pereira, I.; Delgado-Garcia, J. M.; Penninger, J. M.; Carrion, A. M. Lack of DREAM Protein Enhances Learning and Memory and Slows Brain Aging. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 1332.
83. Montminy, M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 807-822.
84. Dash, P. K.; Hochner, B.; Kandel, E. R. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* **1990**, *345*, 718-21.
85. (a) Molineux, M. L.; Fernandez, F. R.; Mehaffey, W. H.; Turner, R. W. A-type and T-type currents interact to produce a novel spike latency-voltage relationship in cerebellar stellate cells. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10863-10873; (b) Anderson, D.; Engbers, J. D. T.; Heath, N. C.; Bartoletti, T. M.; Mehaffey, W. H.; Zamponi, G. W.; Turner, R. W. The Cav3-Kv4 complex acts as a calcium sensor to maintain inhibitory charge transfer during extracellular calcium fluctuations. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 7811-7824.
86. Ronkainen, J. J.; Hanninen, S. L.; Korhonen, T.; Koivumaki, J. T.; Skoumal, R.; Rautio, S.; Ronkainen, V.-P.; Tavi, P. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II represses cardiac transcription of the L-type calcium channel $\alpha 1C$ -subunit gene (Cacna1c) by DREAM translocation. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2669-2686.

87. (a) Pietrzik, C.; Behl, C. Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *Int. J. Exp. Pathol.* **2005**, *86*, 173-185; (b) De Strooper, B. Aph-1, pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron* **2003**, *38*, 9-12; (c) Edbauer, D.; Winkler, E.; Regula, J. T.; Pesold, B.; Steiner, H.; Haass, C. Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat. Cell. Biol.* **2003**, *5*, 486-488.
88. (a) Choi, E.-K.; Zaidi, N. F.; Miller, J. S.; Crowley, A. C.; Merriam, D. E.; Lilliehook, C.; Buxbaum, J. D.; Wasco, W. Calsenilin is a substrate for Caspase-3 that preferentially interacts with the familial Alzheimer's disease-associated C-terminal fragment of presenilin 2. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19197-19204; (b) Jo, D.-G.; Kim, M.-J.; Choi, Y. H.; Kim, I.-K.; Song, Y.-H.; Woo, H.-N.; Chung, C.-W.; Jung, Y.-K. Pro-apoptotic function of calsenilin/DREAM/KCHIP3. *FASEB J.* **2001**, *15*, 589-591.
89. Parmentier, M.; Libert, F.; Maenhaut, C.; Lefort, A.; Gerard, C.; Perret, J.; Van Sande, J.; Dumont, J. E.; Vassart, G. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* **1989**, *246*, 1620-1622.
90. Kopp, P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1301-1322.
91. Ramachandran, N.; Raphael, J. V.; Hainsworth, E.; Demirkan, G.; Fuentes, M. G.; Rolfs, A.; Hu, Y.; LaBaer, J. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 535-538.
92. (a) Mellstrom, B.; Kastanauskaite, A.; Gonzalez, P.; Dopazo, X. M.; Naranjo, J. R.; DeFelipe, J. Specific cytoarchitectural changes in hippocampal subareas in daDREAM mice. *Mol. Brain* **2016**, *9*, 22; (b) Mellstrom, B.; Sahun, I.; Ruiz-Nuno, A.; Murtra, P.; Gomez-Villafuertes, R.; Savignac, M.; Oliveros, J. C.; Gonzalez, P.; Kastanauskaite, A.; Knafo, S.; Zhuo, M.; Higuera-Matas, A.; Errington, M. L.; Maldonado, R.; DeFelipe, J.; Jefferys, J. G. R.; Bliss, T. V. P.; Dierssen, M.; Naranjo, J. R. DREAM controls the on/off switch of specific activity-dependent transcription pathways. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 877-887.
93. (a) Foroud, T.; Siemers, E.; Kleindorfer, D.; Bill, D. J.; Hodes, M. E.; Norton, J. A.; Conneally, P. M.; Christian, J. C. Cognitive scores in carriers of Huntington's disease gene compared to noncarriers. *Ann. Neurol.* **1995**, *37*, 657-664; (b) Lawrence, A. D.; Watkins, L. H.; Sahakian, B. J.; Hodges, J. R.; Robbins, T. W. Visual object and visuospatial cognition in Huntington's disease: implications for information processing in corticostriatal circuits. *Brain* **2000**, *123*, 1349-1364; (c) Lemiere, J.; Decruyenaere, M.; Evers-Kiebooms, G.; Vandenbussche, E.; Dom, R. Cognitive changes in patients with Huntington's disease (HD) and asymptomatic carriers of the HD mutation: a longitudinal follow-up study. *J. Neurol.* **2004**, *251*, 935-942.
94. (a) Mellstrom, B.; Naranjo, J. R. Ca²⁺-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 59-63; (b) Mellstrom, B.; Savignac, M.; Gomez-Villafuertes, R.; Naranjo, J. R. Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiol. Rev.* **2008**, *88*, 421-449.
95. Lilliehook, C.; Bozdagi, O.; Yao, J.; Gomez-Ramirez, M.; Zaidi, N. F.; Wasco, W.; Gandy, S.; Santucci, A. C.; Haroutunian, V.; Huntley, G. W.; Buxbaum, J. D. Altered A β

formation and long-term potentiation in a calsenilin knock-out. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 9097-9106.

96. Birnbaum, S. G.; Varga, A. W.; Yuan, L.-L.; Anderson, A. E.; Sweatt, J. D.; Schrader, L. A. Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 803-833.

CAPÍTULO 1

**Diseño, síntesis y evaluación biológica de la primera
quimioteca de ligandos de DREAM como potenciales
moduladores de Kv4.3/DREAM**

1.1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de DREAM/calsenilina/KChIP3 en el año 1998¹ hasta el comienzo de esta tesis, la investigación en torno a esta proteína se había centrado, fundamentalmente, en la elucidación de la red de interacciones proteína-proteína en la cual participaba. De hecho, en la literatura sólo se habían descrito tres moléculas como ligandos de alguna de las proteínas de la familia de los sensores neuronales de calcio (NCS), conocidas como repaglinida (**1.1**), CL-888 (**1.2**) y NS5806 (**1.3**), que se describen a continuación (Figura 1.1).

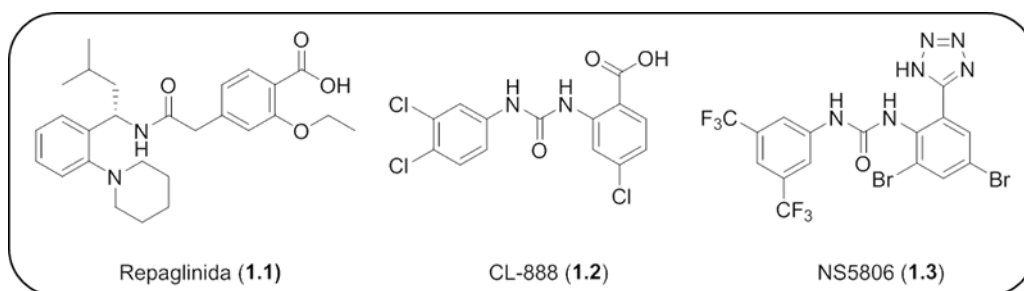


Figura 1.1. Estructura de los ligandos de NCS descritos hasta 2014.

Repaglinida (**1.1**)² es un hipoglucemiante oral comercializado por Novo Nordisk utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.³ Su mecanismo de acción se basa en el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP en las células beta del páncreas, lo que da lugar a una despolarización y a la consiguiente apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes, permitiendo el flujo hacia el interior celular de iones calcio. Este aumento de calcio intracelular, estimula la secreción de la insulina necesaria para transportar la glucosa al interior de las células.⁴ En el año 2003, Okada y col. describieron un estudio cuyo objetivo era la búsqueda de antagonistas selectivos de la superfamilia de los NCS.⁵ Como punto de partida utilizaron 43 compuestos de naturaleza diversa y encontraron que repaglinida se unía a la familia de las

neurocalcinas y de las VILIPs de una manera calcio dependiente, y no a calmodulina o a la proteína S100. Por lo tanto, repaglinida se describió como el primer antagonista de la familia de los NCS constituyendo una valiosa herramienta farmacológica para elucidar el papel fisiológico de esta familia de proteínas. Cabe destacar que glibencamida (**1.4**, Figura 1.2), un hipoglucemiante de la familia de las sulfonilureas, no mostraba afinidad por ninguna de las proteínas de la familia de los NCS.

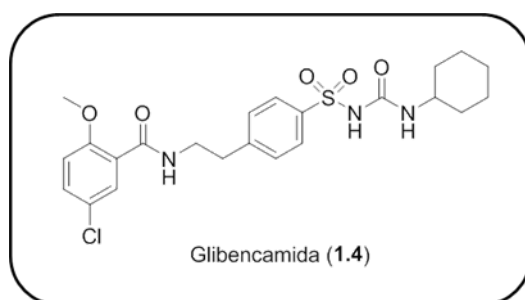


Figura 1.2. Estructura de glibencamida

CL-888 (**1.2**)⁶ es una diaril-urea identificada por investigadores de la empresa Wyeth Research en un cribado de alto rendimiento, cuyo objetivo era la búsqueda de moléculas que pudieran unirse al complejo K_v4.3/KChIP1 e interferir en la interacción entre el canal de potasio K_v4.3 y el sensor neuronal de calcio KChIP1.⁷ Mediante experimentos de afinidad, utilizando las técnicas de resonancia de plasmón de superficie (SPR) y de cromatografía de exclusión, estudiaron el efecto de la unión de CL-888 al complejo K_v4.3/KChIP1. De estos estudios, los autores pudieron concluir que CL-888 se unía directamente a KChIP1, pero no disociaba el complejo K_v4.3/KChIP1. Además, dicha unión originaba un cambio conformacional que modulaba la función del complejo K_v4.3/KChIP1. Estudios de electrofisiología corroboraron esta conclusión ya que en presencia de CL-888, se modificaba la amplitud y la cinética de la corriente generada por el sistema K_v4.3/KChIP1. Mediante estudios de modelización molecular con KChIP1, los autores propusieron un bolsillo de carácter hidrófobo, donde se acomodaba CL-888, en una región cercana al Trp129 de KChIP1. Aprovechando la fluorescencia intrínseca del triptófano, llevaron a cabo estudios de espectroscopía de fluorescencia, confirmando así la unión de CL-888 en el sitio propuesto.⁷

NS5806 (**1.3**) es un compuesto sintetizado por NeuronSearch S/A. En una colaboración conjunta con investigadores del Centro de Investigación Danés de

arritmias cardíacas y el Laboratorio de Investigación Médica Masonic, este compuesto se identificó como el primer activador de la corriente I_{TO} generada por los canales de potasio $K_{V4.3}$ en el corazón.⁸ Asimismo, presentaba la capacidad de revertir la disminución de dicha corriente tras un fallo cardíaco en modelos caninos.⁸⁻⁹ Además, describieron que este efecto sólo tenía lugar en presencia de KChIP2.¹⁰ Estudios posteriores realizados por el grupo del Prof. R. Bähring, permitieron la caracterización del efecto de NS5806 sobre la corriente I_{SA} generada por los canales $K_{V4.3}$ en neuronas.¹¹ En estos estudios se observó que NS5806 en neuronas, también se comportaba como activador de la corriente I_{SA} y que su efecto era dependiente de la presencia de KChIPs y de la dipeptidil-peptidasa DPP6-S. En el año 2014, y durante el transcurso de esta tesis, investigadores de la Universidad Internacional de Florida, mediante espectroscopía de fluorescencia, calorimetría y simulaciones de docking, determinaron que NS5806 se unía a DREAM de manera Ca^{2+} dependiente, provocando una serie de cambios conformacionales en DREAM, que, en última instancia, daban lugar a la modulación de la corriente generada por $K_{V4.3}$.¹²

1.2. ANTECEDENTES

Desde el año 2011, una de las líneas de trabajo de nuestro grupo de investigación se ha centrado en la búsqueda de ligandos de DREAM. Esta investigación se inició mediante una colaboración con el grupo del Prof. J. R. Naranjo del Centro Nacional de Biotecnología y CIBERNED, pionero en el descubrimiento de DREAM y en el estudio de su interactoma. Este grupo observó que antes de la aparición de alteraciones patológicas en la enfermedad de Huntington se observaba una caída en la expresión de la proteína DREAM en cerebro. Estos resultados preliminares apuntaban a que la proteína DREAM tenía un papel relevante en el inicio y la progresión de la enfermedad. Asimismo, identificaron a DREAM como posible diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, abriendo una nueva vía de búsqueda de fármacos que poseyeran capacidad para inhibir la expresión y/o actividad de DREAM en cerebro. Dada la alta homología de secuencia entre los distintos miembros de la superfamilia de los sensores neuronales de calcio, se consideró que el estudio de ligandos descritos para otros sensores neuronales de calcio, repaglinida y CL-888, podría ser un buen punto de partida para la búsqueda de inhibidores de DREAM. En primer lugar, se llevó a cabo la evaluación de la interacción de CL-888 y repaglinida con DREAM mediante técnicas de Pull-Down y resonancia de plasmón de superficie (SPR). Ambos experimentos indicaron que tanto CL-888 como repaglinida se unían a DREAM, presentando este último mayor potencia. A continuación, en colaboración con

el grupo de la Dr. C. Valenzuela (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM), se estudió el efecto de ambos compuestos sobre la corriente generada por los canales $K_{v4.3}$, ensamblados o no a la subunidad reguladora DREAM. En estos estudios se utilizó la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (*patch clamp*), empleando para ello la configuración de célula entera. Estos ensayos, mostraron que glibencamida no presentaba ningún tipo de efecto sobre la corriente generada por los canales $K_{v4.3}$ /DREAM, mientras que la unión de CL-888 o repaglinida a DREAM inhibía la corriente generada por $K_{v4.3}$, produciendo una disminución en la amplitud de la corriente y una aceleración de las cinéticas de inactivación. Además, tal como se había descrito para CL-888 y KChIP1,⁷ en ninguno de los casos se modificaba la recuperación de la cinética de inactivación ni la dependencia de voltaje de la inactivación.

1.3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes comentados, el objetivo principal del presente capítulo se centró en el diseño, síntesis y evaluación biológica de una primera quimioteca de ligandos de DREAM como herramientas farmacológicas para el estudio de su interactoma. Para la consecución de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos concretos, que de manera esquemática, se recogen en la Figura 1.5:

- Búsqueda de un cabeza de serie a partir de la estructura de CL-888, mediante la incorporación de modificaciones estructurales en el espaciador que une los dos anillos aromáticos.
- Optimización del cabeza de serie mediante la incorporación de diversas modificaciones en distintos puntos de su estructura, con el fin de identificar los grupos funcionales, fragmentos o rasgos estructurales relevantes para incrementar la afinidad por la proteína DREAM.
- Definir las primeras relaciones estructura-actividad (SAR).
- Estudiar el efecto sobre la modulación de la interacción $K_v4.3$ /DREAM.

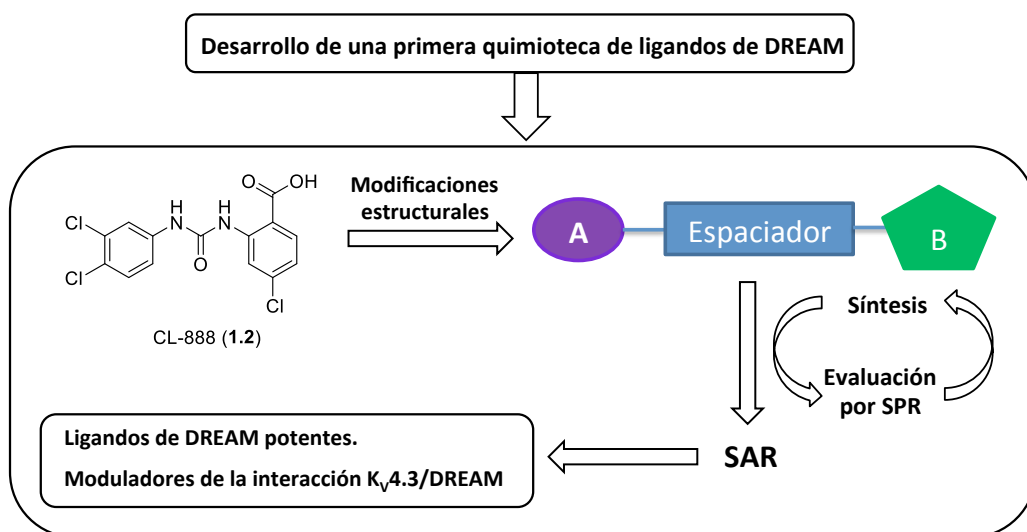


Figura 1.5. Representación esquemática de los objetivos propuestos en este capítulo

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Búsqueda de nuevos ligandos de DREAM. Elección del cabeza de serie

El diseño de nuevos ligandos de DREAM se basó en las estructuras de repaglinida (**1.1**) y CL-888 (**1.2**), comentados en los antecedentes. Cuando este trabajo comenzó en el año 2011, no se había determinado experimentalmente el sitio de unión de estos ligandos a DREAM. El análisis de la estructura de dichos ligandos revelaba un denominador común: la presencia de dos anillos aromáticos unidos por un espaciador de tipo amida o urea con uno o dos grupos metilenos. Tomando como punto de partida esta información y con el objetivo de identificar un primer cabeza de serie, en primer lugar se decidió explorar el espaciador óptimo que uniera los residuos hidrófobos (Figura 1.6). Dado, por una parte, la accesibilidad sintética de análogos de CL-888 (**1.2**) a partir de reactivos comerciales y, por otra, la existencia de un amplio espacio intelectual para posibles patentes que reivindicaran los futuros compuestos, se decidió considerar como prototipo a CL-888 (**1.2**). De esta manera, se plantearon tres series de compuestos donde se modificaba la longitud (serie 1) y la naturaleza del espaciador (serie 2 y 3) (Figura 1.6). En la serie 1, se aumentó en un eslabón la longitud del espaciador, mediante la incorporación de un grupo metileno. En la serie 2, se sustituyó el grupo carbamoilamino por un grupo amida. Finalmente, teniendo en cuenta las similitudes estructurales entre los grupos carboxamida y 1,2,3-triazol, considerados bioisómeros,¹³ en la serie 3 se incorporó este anillo como espaciador. Inicialmente se abordó la síntesis de los prototipos **1.5-1.7**.

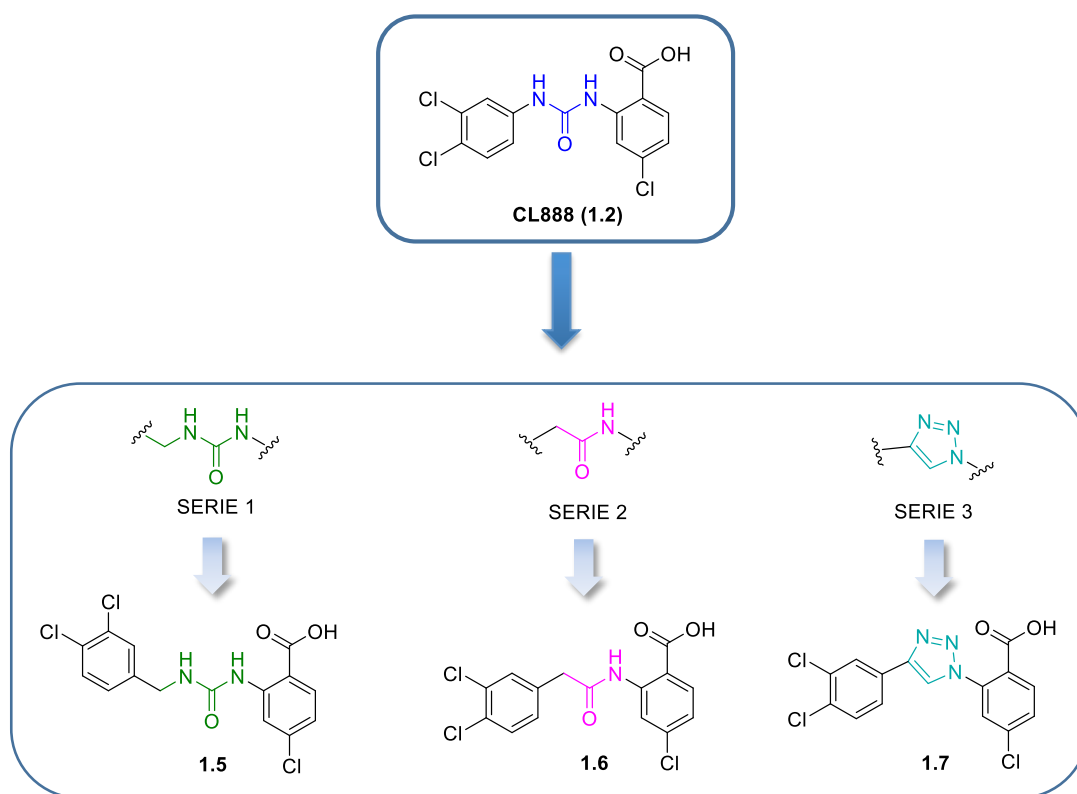
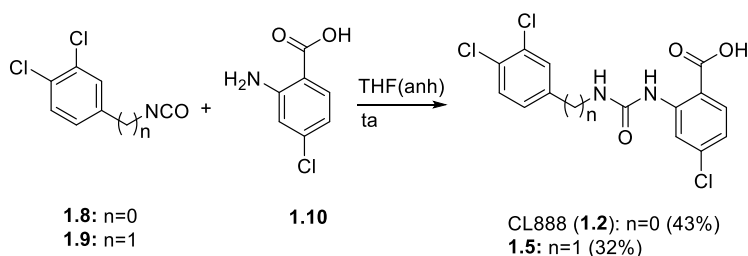


Figura 1.6. Diseño de nuevos prototipos: búsqueda de un cabeza de serie

1.4.1.1. Síntesis de CL-888 (1.2) y compuestos prototipo 1.5-1.7

A) Síntesis de ureas

La síntesis tanto de CL-888 (1.2) como del derivado **1.5** se llevó a cabo aplicando la metodología general de síntesis de ureas. Como se recoge en el Esquema 1.1, esta síntesis consiste en hacer reaccionar el isocianato de interés (**1.8-1.9**) con el ácido 2-amino-4-clorobenzoico (**1.10**), a temperatura ambiente en tetrahidrofurano anhidro (THF) como disolvente.¹⁴



Esquema 1.1. Metodología para la síntesis de CL-888 (1.2) y 1.5

Los productos deseados se obtuvieron con bajos rendimientos debido a la formación de una mezcla compleja de varios subproductos. El análisis mediante HPLC-MS del crudo de reacción permitió identificar a las quinazolin-di-onas **1.11** y **1.12** como productos resultantes de la ciclación intramolecular (Figura 1.7). Además, la baja solubilidad de los derivados deseados **1.2** y **1.5** tanto en disolventes polares como apolares, dificultó la purificación de los mismos, contribuyendo también a los bajos rendimientos obtenidos.

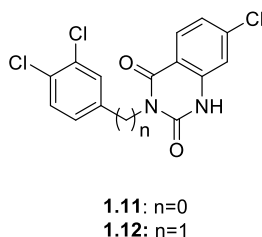
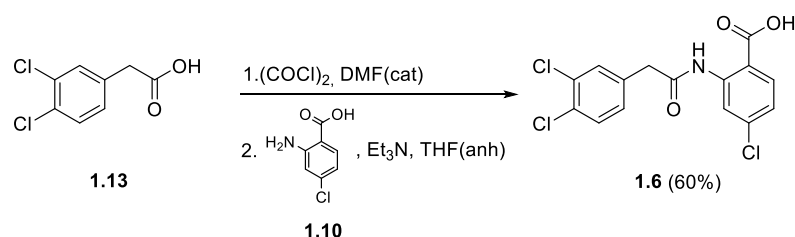


Figura 1.7. Productos de ciclación intramolecular de los isocianatos de partida obtenidos en la formación de **1.2** y **1.5**

B) Síntesis de amidas

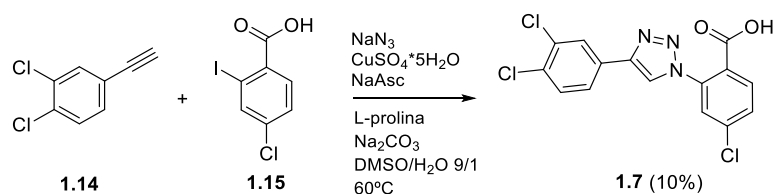
Entre los distintos métodos descritos para la formación de amidas, se seleccionó aquel que consiste en la transformación del ácido carboxílico en su correspondiente cloruro de ácido intermedio, utilizando cloruro de oxalilo en presencia de cantidades catalíticas de dimetilformamida (DMF). Siguiendo esta metodología, el derivado en el que el grupo ureido se sustituye por un metilencarboxamido **1.6** se obtuvo, con un 60% de rendimiento, en dos pasos de reacción mediante la ruta sintética indicada en el Esquema 1.2.¹⁵



Esquema 1.2. Síntesis del derivado con un espaciador metilencarboxamido **1.6**

C) Síntesis de triazoles

La síntesis del derivado **1.7**, portador de un anillo de 1,2,3-triazol, se llevó a cabo mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I), también conocida como “click chemistry”.¹⁶ Teniendo en cuenta la facilidad de explosión de las azidas de bajo peso molecular, Feldman y *col.* desarrollaron una metodología mediante la cual las azidas de partida eran generadas *in situ* a partir de aril o vinil yoduros, y utilizadas, posteriormente, sin necesidad de aislamiento.¹⁷ Siguiendo esta metodología se procedió a la síntesis del derivado **1.7** empleando como reactivos de partida 1,2-dicloro-4-etinilbenceno (**1.14**), ácido 4-cloro-2-iodobenzoico (**1.15**) y NaN₃ en presencia de CuSO₄·H₂O, ascorbato sódico (NaAsc) y L-prolina (Esquema 1.3). El producto deseado **1.7** se obtuvo, tras cristalización en metanol, con un rendimiento del 10%.



Esquema 1.3. Síntesis del derivado de triazol **1.7** utilizando la metodología de Feldman y *col.*¹⁷

Dado el bajo rendimiento obtenido para el derivado **1.7**, se decidió llevar a cabo un proceso de optimización. En el año 2010, Shao y *col.* realizaron con éxito reacciones de cicloadición 1,3-dipolar con diferentes azidas alquílicas o aromáticas y alquinos vinílicos o aromáticos en presencia de ácidos carboxílicos.¹⁸ Estos agentes tenían la capacidad de formar complejos di- y polinucleares de carboxilatos de Cu(I) para promover la etapa de formación del acetiluro de Cu(I) y la de protonación del enlace Cu-C (Figura 1.8).

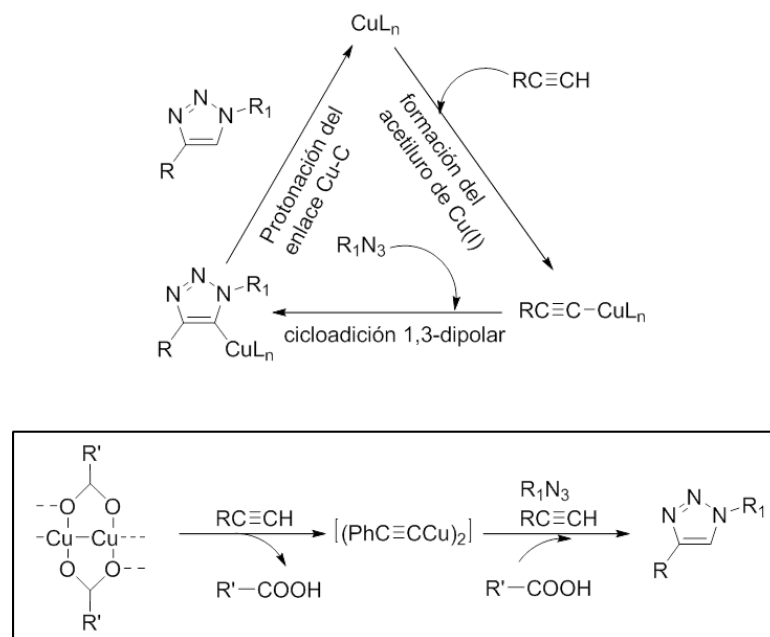
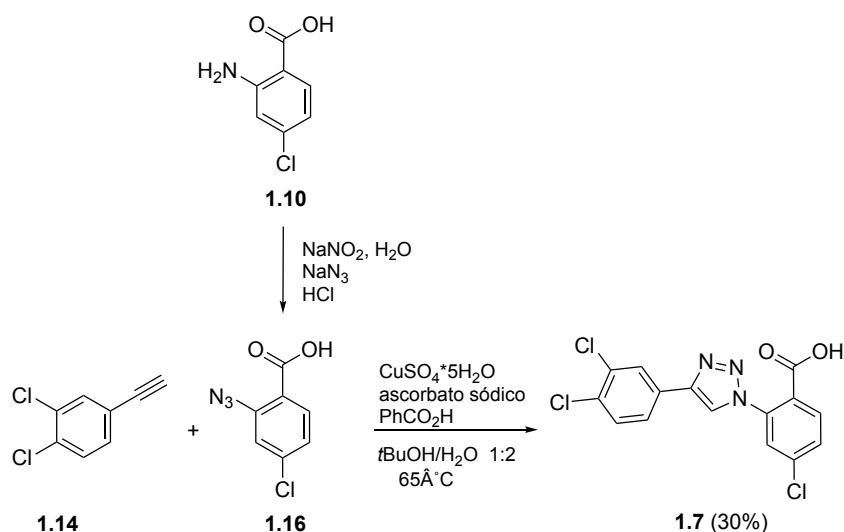


Figura 1.8. Efecto de los ácidos carboxílicos en las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar

Siguiendo esta metodología, se llevó a cabo la síntesis de **1.7** empleando como agente quelante el ácido benzoico (Esquema 1.4). La azida **1.16** se sintetizó mediante diazotación de la amina **1.10** con ácido nitroso seguido de reacción con NaN_3 .¹⁹ El producto deseado **1.7** se aisló mediante cristalización en metanol con un 30% de rendimiento.



Esquema 1.4. Síntesis del derivado de triazol **1.7** siguiendo la metodología de Shao y col.¹⁸

1.4.1.2. Evaluación de la unión a DREAM mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR)

Con el objetivo de identificar un primer cabeza de serie para la búsqueda de nuevos ligandos de DREAM, se evaluó la capacidad de unión de los compuestos prototipo sintetizados **1.5-1.7** en comparación con repaglinida y CL-888, mediante la técnica de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Estos ensayos se realizaron en la Unidad de SPR del Instituto de Química Médica con un equipo Biacore X100. En el Anexo 2 se recogen los fundamentos de la técnica.

De manera general, la técnica de SPR permite visualizar en tiempo real la interacción entre una molécula/proteína, denominado ligando, anclada en la superficie de un chip sensor y un analito que circula en disolución. En nuestro caso, el ligando fue la proteína DREAM con un “tag” de GST. La inmovilización covalente de DREAM se realizó mediante la formación de un enlace amida entre los grupos amino de la proteína y los grupos carboxilo presentes en la superficie del chip.²⁰ Cuando el chip se introdujo en el equipo, se definieron los canales Fc1 y Fc2. En todas las medidas, Fc1 se empleó como superficie control, para restar las interacciones específicas provenientes de la matriz, y Fc2 para inmovilizar GST-DREAM. Para la activación de los grupos carboxilo de la matriz se empleó una mezcla 1:1 de *N*-hidroxisulfonamida (NHS):1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), lo que condujo a la formación de ésteres de *N*-hidroxisulfonamida que reaccionaron espontáneamente con los grupos amino libres que GST-DREAM presenta en su estructura. Dada la mayor accesibilidad del grupo amino del extremo *N*-terminal, la mayor parte de la proteína se había anclado al chip por este extremo. De esta manera, se inmovilizaron 8000 RUs (unidades de respuesta) de GST-DREAM sobre la superficie del chip. Para evitar que los grupos carboxilo pudiesen interferir en la interacción, se llevó a cabo el bloqueo de la superficie control con etanolamina. Tras la inmovilización de GST-DREAM sobre la superficie del biosensor, se inyectaron los controles y los distintos compuestos de interés a una concentración de 5 μ M. En los experimentos se emplearon repaglinida (RP, **1.1**) y CL-888 (**1.2**) como controles positivos y del estado de GST-DREAM inmovilizada en la superficie del chip. Como control negativo se eligió la molécula de glibencamida (Gb, **1.4**) un compuesto hipoglucemiante de la familia de las sulfonilureas, que, como se ha comentado en los Antecedentes, no se une a DREAM.

En la Figura 1.9, se muestran las señales de SPR de los controles y de cada uno de los compuestos prototipo **1.5-1.7**. Para facilitar la comparación de los datos obtenidos, éstos se muestran en forma de diagrama de barras. En esta representación, la

cuantificación de la interacción compuesto-DREAM se ha determinado a partir del nivel RU alcanzado a los 40 segundos de la inyección.

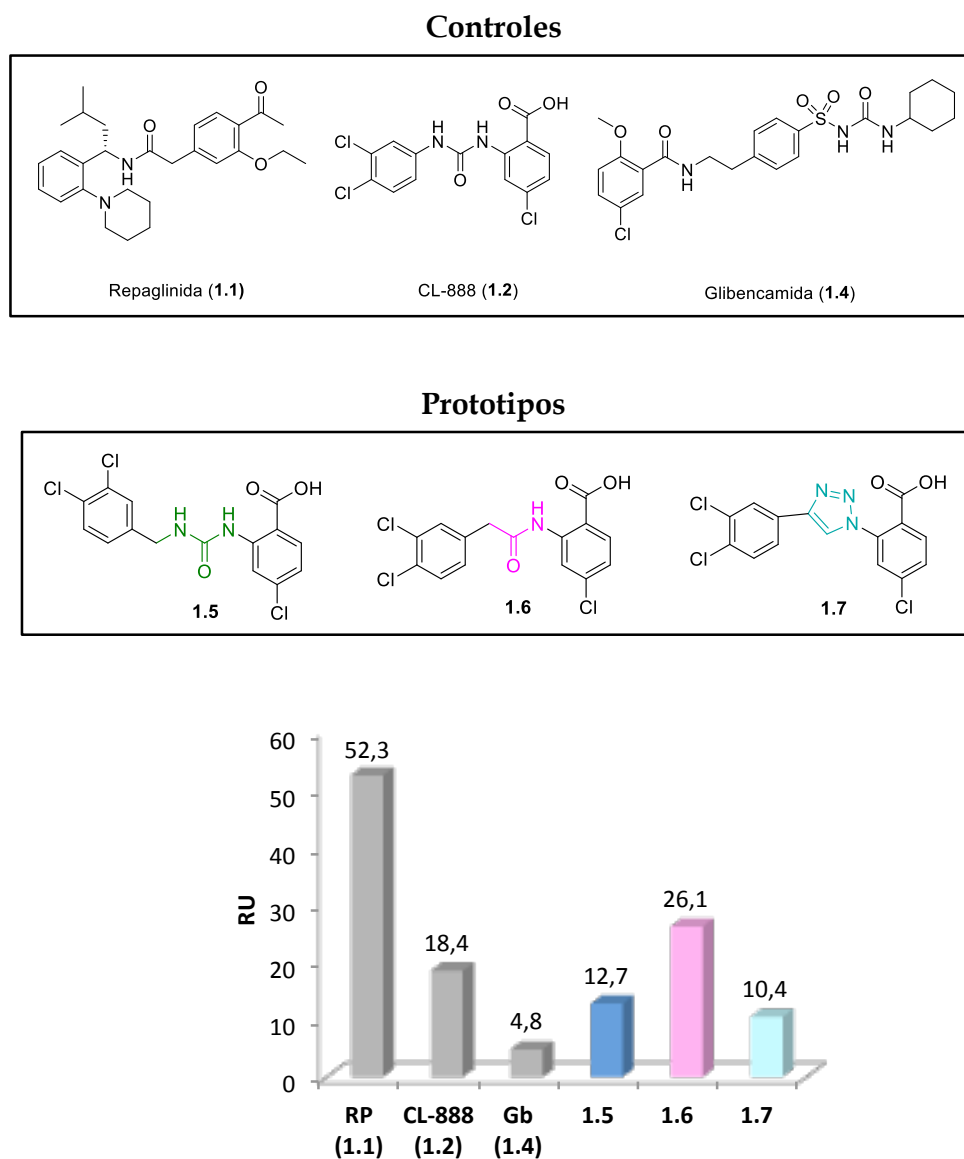


Figura 1.9. A: Sensogramas obtenidos en la interacción con GST-DREAM, de los controles positivos, negativo y de cada uno de los prototipos objeto de estudio **1.5-1.7**. B: Diagrama de barras que muestra la interacción con GST-DREAM de los controles positivos (RP y 1.2), negativo (Gb) y de cada uno de los compuestos objeto de estudio (**1.5-1.7**) compuesto-DREAM a los 40 s de la inyección. Los controles se muestran en gris.

A la vista de los datos del estudio de la interacción de los compuestos preparados con GST-DREAM cabe destacar, que, tanto la incorporación de un grupo metileno en el espaciador tipo urea (derivado **1.5**), como la sustitución por un anillo de triazol (derivado **1.7**), dan lugar a una disminución en la capacidad de unión de estos

derivados a GST-DREAM, con respecto a la unión mostrada por CL-888 (1.2). Sin embargo, cuando se comparan las respuestas obtenidas del derivado 1.6 y de CL-888 (1.1), se puede observar que la sustitución del espaciador tipo urea por uno carboxamida, conduce a un aumento en la capacidad de unión a GST-DREAM. Es importante resaltar que aunque en ninguno de los casos se ha obtenido una señal similar o superior a la mostrada por repaglinida (1.1), estos resultados permiten definir al derivado 1.6, portador de un espaciador amida y un grupo metileno, como un cabeza de serie. La posterior optimización de este cabeza de serie mediante modificaciones dirigidas a mejorar su efecto, podría conducir a compuestos con alta afinidad por DREAM.

1.4.2. Optimización del cabeza de serie 1.6: Diseño, síntesis y evaluación biológica. Estudios de relaciones estructura-actividad

Con la finalidad de llevar a cabo una búsqueda de nuevos ligandos de DREAM que muestren mayor potencia, se procedió al diseño y la síntesis de una pequeña quimioteca de análogos del cabeza de serie 1.6. Esta quimioteca se diseñó de manera que permitiese determinar los requisitos estructurales esenciales para mantener la afinidad por DREAM. Como se indica de forma esquemática en la Figura 1.10, se analizó el efecto de diferentes sustituyentes sobre los anillos A y B, y su sustitución por anillos aromáticos bicíclicos. Además, en relación al espaciador, se estudió la influencia de la longitud y de la presencia de diferentes agrupamientos. Dado que este estudio se basó fundamentalmente en la preparación de amidas análogas de 1.6, fue necesario realizar una optimización de las condiciones de síntesis para obtener los productos deseados con buenos rendimientos. Los estudios de afinidad por DREAM de los nuevos derivados se realizaron mediante la técnica de SPR.

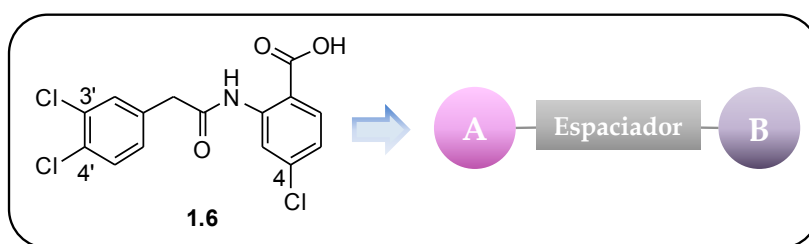


Figura 1.10. Representación esquemática de los fragmentos del prototipo 1.6 objeto de estudio

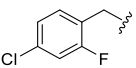
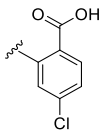
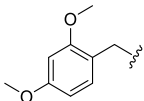
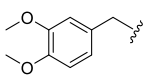
A continuación se detallan las modificaciones realizadas, las condiciones de reacción empleadas y los resultados biológicos obtenidos.

1.4.2.1. Modificaciones en el anillo A. Optimización de condiciones de reacción

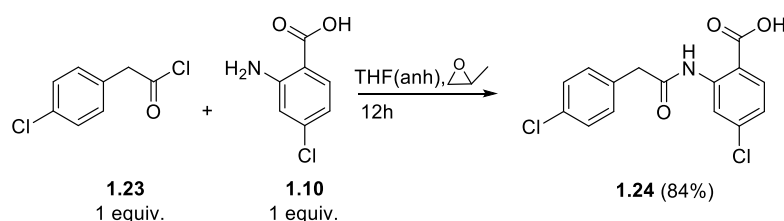
Con objeto de estudiar la influencia de la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo A sobre la capacidad de unión a DREAM, se llevaron a cabo distintas modificaciones sobre este anillo: se sustituyó uno o los dos átomos de cloro por hidrógeno, grupos hidroxilo, trifluorometilo, metoxilo y fenoxilo. Asimismo, se exploró el efecto de la presencia de sustituyentes adicionales en otras posiciones del anillo A.

Como se recoge en la Tabla 1.1, las primeras modificaciones realizadas sobre el anillo A se basaron en la sustitución del átomo de cloro por hidrógeno o metoxilo, y la incorporación de sustituyentes en distintas posiciones. La síntesis de estos análogos de **1.6** (**1.20-1.22**) se realizó de forma similar a la preparación del cabeza de serie **1.6**. La metodología consistió en la condensación entre el cloruro de ácido intermedio, derivado del correspondiente ácido carboxílico (**1.17-1.19**), y el ácido 2-amino-4-clorobenzoico (**1.10**), en presencia de Et₃N como agente captador del HCl generado y THF como disolvente. Los cloruros de ácido no comerciales se prepararon utilizando (COCl)₂ como agente de condensación y DMF como catalizador.

Tabla 1.1. Modificaciones estructurales en el anillo A. Síntesis de los derivados **1.20-1.22**

| $ \begin{array}{ccc} \text{R}_A\text{COOH} & \xrightarrow[2. \text{NH}_2\text{R}_B \text{ (1.10), THF, Et}_3\text{N}]{1. (\text{COCl})_2, \text{DMF}} & \text{R}_A\text{CONHR}_B \\ \text{1.17-1.19} & & \text{1.20-1.22} \end{array} $ | | | | | |
|--|-------|-------|--|---|----|
| ÁCIDO | AMINA | AMIDA | R _A | R _B | R% |
| 1.17 | 1.10 | 1.20 |  |  | 24 |
| 1.18 | | 1.21 |  | | 45 |
| 1.19 | | 1.22 |  | | 23 |

Con el fin de determinar si los bajos rendimientos obtenidos se debían a la preparación de los correspondientes cloruros de ácido, se estudió la formación de la amida a partir de un cloruro de ácido comercial. Además, se sustituyó la Et_3N por óxido de propileno, como captador del HCl formado en la reacción, ya que el subproducto que se forma utilizando óxido de propileno es volátil y facilita las purificaciones (Esquema 1.5). Así, la reacción entre el cloruro de ácido comercial **1.23** (1 eqv) y el ácido 2-amino-4-clorobenzoico (**1.10**, 1 eqv) dio lugar a la amida **1.24** con un 84% de rendimiento.



Esquema 1.5. Síntesis de la amida **1.24** a partir del cloruro de ácido comercial **1.23**

Estos resultados indicaban que la formación del cloruro de ácido podría ser la etapa clave que limita el rendimiento. Por tanto, se decidió cambiar la estrategia de formación de los correspondientes cloruros de ácido. Con el fin de encontrar el método de síntesis óptimo se estudiaron diferentes condiciones de reacción para la preparación del cabeza de serie **1.6**. Además, para evaluar si la protección de un grupo ácido por un éster metílico podría mejorar el rendimiento de la reacción, se estudió la síntesis del análogo en forma de éster metílico, a partir del ácido carboxílico **1.13** y la amina **1.25**. Como se muestra en la Tabla 1.2, la utilización de cloruro de tionilo (SOCl_2) en la preparación del cloruro de ácido intermedio y un aumento de la relación molar ácido:amina de 1.1:1 a 1.3:1, condujo a un incremento en los rendimientos de **1.6** y **1.26** (Tabla 1.2, Entrada 2). Dicho aumento fue notable en el caso del éster metílico **1.26**, que se obtuvo con un rendimiento del 55% (Tabla 1.2, entrada 2, método B), frente al 16% empleando cloruro de oxalilo ($(\text{COCl})_2$) y una relación molar ácido:amina 1.1:1 (Tabla 1.2, entrada 1, método A). Aunque aplicando la metodología B se obtuvieron buenos resultados, el análisis del crudo de reacción de **1.26** por HPLC-MS, reveló la presencia de un pico correspondiente a la amina de partida **1.25** (10%). En base a este hecho, se decidió aumentar la relación molar ácido:amina de 1.3:1 a 1.5:1 manteniendo las condiciones del método B (Tabla 2, entrada 3, método C). Sin embargo, un incremento en la concentración del ácido, no se tradujo en una mejora del rendimiento para la obtención del derivado **1.6**. Por el contrario, en el caso del éster metílico **1.26** se produjo

un aumento significativo del rendimiento de reacción, obteniéndose un 64% (Tabla 2, entrada 3, método C).

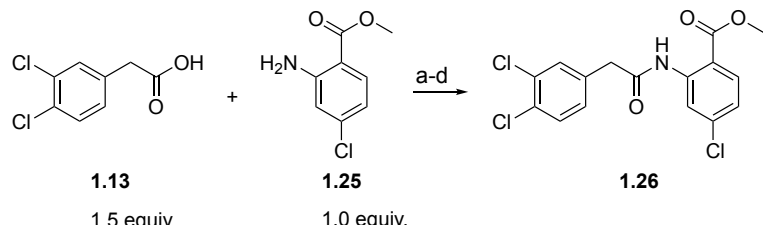
Tabla 1.2. Optimización de las condiciones de reacción para la formación de enlace amida

| ENTRADA | MÉTODO | REACTIVO DE CLORACIÓN | RELACIÓN MOLAR ácido:amina | T (°C) | Rdto (%) | |
|---------|--------|-----------------------|----------------------------|--------|----------|------|
| | | | | | 1.6 | 1.26 |
| 1 | A | (COCl) ₂ | 1.1:1 | 0-25 | 60 | 16 |
| 2 | B | SOCl ₂ | 1.3:1 | 100 | 71 | 55 |
| 3 | C | SOCl ₂ | 1.5:1 | 100 | 73 | 64 |

De manera paralela a la optimización de la preparación de amidas mediante la formación de los correspondientes cloruros de ácido, se realizó un estudio de obtención de amidas utilizando agentes de acoplamiento. En este estudio, se decidió utilizar como reacción patrón la formación del derivado en forma de éster metílico **1.26** a partir del ácido 2-(3,4-diclorofenil)acético **1.13** y el 2-amino-4-clorobenzoato de metilo **1.25** en DMF anhidra en presencia de *N*-metilmorfolina (NMM) o *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA) como base. Como agentes de acoplamiento, se emplearon 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como aditivo y las sales de fosfonio hexafluorofosfato (V) de 1-óxido-3-(bis(dimetilamino)metilen)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina (HATU), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU) y hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-*N*-oxi-tria(pirrolidino)fosfonio (PyOAP). Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente o a 80°C en un reactor de microondas empleándose tiempos de reacción de 6 min a 4 días. El curso de reacción se siguió por HPLC. Como se muestra en la Tabla 1.3, el derivado **1.26** no se obtuvo con ninguna de las condiciones estudiadas. Únicamente,

se observó una conversión del 10% cuando se utilizó HATU como agente de acoplamiento y calefacción por microondas a 80°C durante 6 min, conversión que no aumentó al incrementar el tiempo de reacción a 2 h.

Tabla 1.3. Condiciones de reacción y variaciones de conversión en la síntesis de **1.26** mediante el uso de agentes de acoplamiento

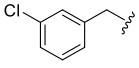
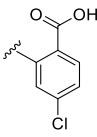
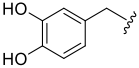
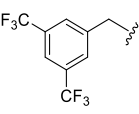
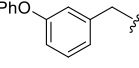
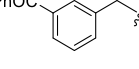
|  <p style="text-align: center;"> 1.13 1.25 1.26 1.5 equiv. 1.0 equiv. </p> <p style="text-align: center;">Reactivos: a) HOBt/EDC, NMM; b) HATU, DIPEA; c) COMU, DIPEA; d) PyOAP, DIPEA</p> | | | | |
|---|---------------------------------|--------|-----------------|------------------------|
| Base (5.0 equiv.) | A. Acoplamiento (1.5 equiv.) | Tiempo | T (°C) | % (UV) ^b |
| NMM | HOBt/EDC | 4 días | 23 | - |
| | | 5h | 23 | - |
| | HATU | 6 min | 80 ^a | 10 |
| | | 2 h | 80 ^a | 10 |
| | COMU | 6 min | 80 ^a | - |
| DIPEA | PyOAP | 6 min | 80 ^a | - |

^aCalefacción por microondas. ^bDato de conversión obtenido por HPLC con un gradiente de 50-95% de acetonitrilo en H₂O en 20 min a 254 nm

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios de optimización, se decidió que la síntesis de los derivados portadores de un espaciador tipo amida se realizaría en dos etapas. La primera consistiría en la preparación del cloruro de ácido a partir del correspondiente ácido por reacción con cloruro de tionilo y, la segunda, en la condensación del cloruro de ácido obtenido con la correspondiente amina, utilizando una relación molar ácido:amina 1.5:1, óxido de propileno como captador del ácido clorhídrico generado y THF anhidro como disolvente (Tabla 1.2, Método C). Siguiendo esta metodología, por reacción de la amina **1.10** con los correspondientes ácidos carboxílicos **1.27-1.31** se obtuvieron los derivados **1.32-1.36**, que presentaron las siguientes modificaciones en el anillo A (Tabla 1.4): A) Eliminación del átomo de cloro en posición 4' (**1.32**); B) Incorporación de grupos hidroxilo (**1.33**), trifluorometilo (**1.34**), fenoxilo (**1.35**) y benzoilo (**1.36**) en distintas posiciones. Los productos deseados

presentaron problemas de solubilidad tanto en disolventes polares como apolares, lo que dificultó el aislamiento de los mismos. Sin embargo, en todos los casos se alcanzaron rendimientos en torno al 50% y purezas superiores al 95%.

Tabla 1.4. Modificaciones estructurales en el anillo A. Síntesis de los derivados **1.32-1.36**

| $ \begin{array}{c} \text{R}_A\text{COOH} \xrightarrow[2. \text{NH}_2\text{R}_B (1.10), \text{THF}, \text{Et}_3\text{N}]{1. \text{SOCl}_2} \text{R}_A\text{CONHR}_B \\ \text{1.27-1.31} \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{1.32-1.36} \end{array} $ | | | | | |
|---|-------|-------|--|---|--------|
| ÁCIDO | AMINA | AMIDA | R _A | R _B | Rdto % |
| 1.27 | 1.10 | 1.32 |  |  | 54 |
| 1.28 | | 1.33 |  | | 52 |
| 1.29 | | 1.34 |  | | 76 |
| 1.30 | | 1.35 |  | | 54 |
| 1.31 | | 1.36 |  | | 40 |

1.4.2.2. Modificaciones en el anillo B. Síntesis

Con el fin de estudiar la influencia de los sustituyentes en el anillo B sobre la actividad, se realizaron:

A) Modificaciones en el anillo B para estudiar la influencia del ácido carboxílico y su posición.

- B) Modificaciones en el sustituyente en posición 4.
- C) Modificaciones en el patrón de sustitución con respecto al cabeza de serie **1.6**.
- D) Extensión del anillo aromático B.

La preparación de alguno de los derivados modificados en el anillo B se realizó en paralelo con las modificaciones en el anillo A, previamente a la optimización del método de síntesis, por lo que, para la formación del enlace amida se emplearon tanto $(\text{COCl})_2$ (Tabla 1.2, Método A) como SOCl_2 (Tabla 1.2, Método C) para la formación del cloruro de ácido. Se ha considerado relevante indicar en cada caso la metodología empleada para la formación del agrupamiento amida.

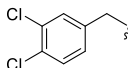


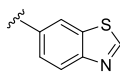
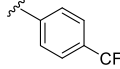
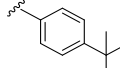
A) Modificaciones en el anillo B para estudiar la influencia del ácido carboxílico y su posición

Para evaluar la influencia sobre la actividad de distintas sustituciones y funcionalidades en el anillo B, inicialmente, se sustituyó el grupo carboxilo por un átomo de hidrógeno, y a continuación se exploró la eliminación del grupo carboxilo y la incorporación de otras funcionalidades en distintas posiciones: metoxilo, trifluorometilo o *terc*-butilo (Tabla 1.5).

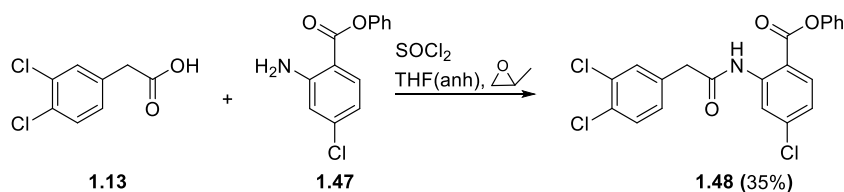
Asimismo, se llevó a cabo la sustitución del anillo de fenilo por un anillo de benzotiazol. Con este objetivo, se seleccionó un conjunto de aminas comerciales diferentemente sustituidas **1.37-1.41** que se hicieron reaccionar con el cloruro de ácido obtenido a partir del ácido 3,4-dicloroacético **1.13**, siguiendo distintas metodologías. La síntesis de los derivados **1.42-1.45** se recoge en la tabla 1.5 donde se indica en cada caso el método utilizado para la preparación del cloruro de ácido intermedio.

Como era de esperar los derivados **1.42** y **1.43**, preparados con el Método A, se obtuvieron con rendimientos bajos-moderados, mientras que cuando se utilizó el Método C se obtuvieron los compuestos **1.44-1.46** con buenos rendimientos.

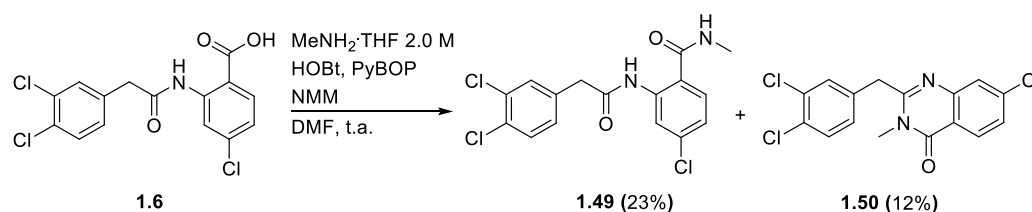
Tabla 1.5. Modificaciones estructurales en el anillo B. Síntesis de los derivados **1.42-1.46**

| <div><div><div><div><div>R_A</div><div>C(=O)OH</div></div><div>1.13</div></div><div><div><div>1. Reactivo de cloración</div><div>2. NH_2R_B (1.37-1.41), THFanh, Et_3N</div></div><div>\longrightarrow</div><div><div><div>R_A</div><div>C(=O)NH</div><div>R_B</div></div><div>$1.42-1.46$</div></div></div></div></div> | | | | | | | | |
|---|-------------------|-------|-------|-------|---|---|--------|--|
| MTDO. | R. CLORACIÓN | ÁCIDO | AMINA | AMIDA | R_A | R_B | Rdto % | |
| A | $(\text{COCl})_2$ | 1.13 | 1.37 | 1.42 |  |  | 53 | |
| | | | 1.38 | 1.43 | |  | 38 | |
| C | SOCl_2 | | 1.39 | 1.44 | |  | 66 | |
| | | | 1.40 | 1.45 | |  | 91 | |
| | | | 1.41 | 1.46 | |  | 56 | |

A continuación, se abordó la sustitución del grupo carboxilo por un agrupamiento de tipo éster -CO₂Ph o amida -CO₂NHCH₃. Como se indica en el Esquema 1.6, a partir del ácido 3,4-dicloro-benzoico (**1.13**), mediante formación del correspondiente cloruro de ácido, y posterior condensación con la amina **1.47** se obtuvo el derivado en forma de éster **1.48** con un rendimiento del 35%. Este bajo rendimiento podría deberse a la baja conversión de los productos de partida, observada mediante el análisis del crudo de reacción por HPLC-MS.

**Esquema 1.6.** Síntesis del éster **1.48** mediante la metodología optimizada (Método C)

La síntesis de la amida **1.49**, se realizó a partir del cabeza de serie **1.6** por tratamiento con una disolución 2.0 M de metilamina en THF, empleando HOBt y hexafluorofosfato de benzotriazolil-*N*-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP), como agentes de acoplamiento, y NMM como base. De esta forma se obtuvo una mezcla de reacción compleja donde se identificó, junto con el producto deseado **1.49**, el subproducto de ciclación intramolecular **1.50** (Esquema 1.7).



Esquema 1.7. Síntesis de **1.49** a partir del cabeza de serie **1.6**

Con el fin de analizar la influencia de la posición del grupo carboxilo en la interacción con DREAM, se diseñaron una serie de derivados portadores del grupo carboxilo en posición *meta* o *para* respecto al grupo amino. (Tabla 1.6).

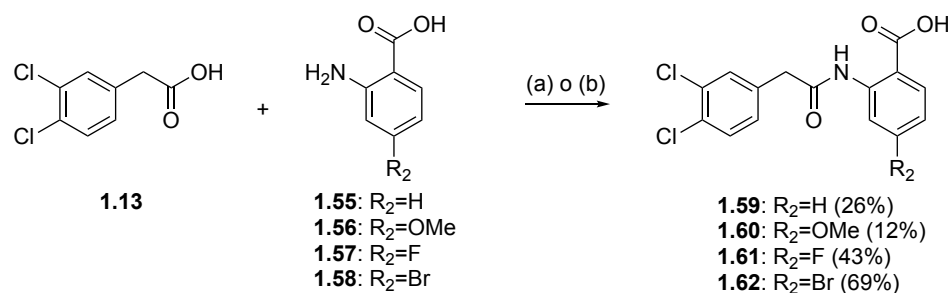
Tabla 1.6. Modificaciones estructurales en el anillo B. Localización del grupo carboxilo. Síntesis de los derivados **1.53** y **1.54**

| ÁCIDO | AMINA | AMIDA | R_A | R_B | Rdto % |
|-------------|-------------|-------------|-------|-------|--------|
| 1.13 | 1.51 | 1.53 | | | 35 |
| | 1.52 | 1.54 | | | 85 |

Como se recoge en la Tabla 1.6, mediante la metodología optimizada para la formación del enlace amida (Método C), a partir del ácido carboxílico **1.13** y las aminas **1.51** y **1.52**, se sintetizaron los correspondientes derivados **1.53** y **1.54**. Nuevamente, la baja solubilidad, que el derivado **1.53** presentó en los disolventes utilizados para la purificación, dificultó el proceso de aislamiento, lo que podría explicar el bajo rendimiento obtenido.

B) Modificaciones del sustituyente en posición 4

Con objeto de evaluar la influencia en la actividad de la naturaleza del sustituyente en posición 4 las amidas diseñadas **1.59-1.62** se prepararon por reacción entre el ácido 3,4-diclorofenilacético **1.13** y la correspondiente amina **1.55-1.58** según se indica en el Esquema 1.8.



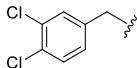
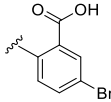
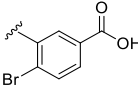
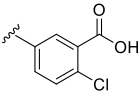
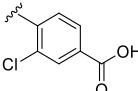
Reactivos: (a) (COCl)₂, DMF, Et₃N, THF; (b) SOCl₂, Óxido de propileno, THF.

Esquema 1.8. Síntesis de amidas con modificaciones en el sustituyente en posición 4 del anillo B. a) **1.59-1.60** mediante el Método A; b) **1.61-1.62** mediante el Método C

C) Modificaciones en el patrón de sustitución con respecto al cabeza de serie **1.6**

Con objeto de estudiar la posición más favorable para la interacción con DREAM tanto del grupo carboxilo como del halógeno en el anillo B, se diseñó una serie de compuestos portadores de dichos grupos en distintas posiciones (Tabla 1.7). La preparación de dichos derivados mediante el Método C, a partir del ácido **1.13** y las correspondientes aminas (**1.63-1.66**), condujo a los productos deseados **1.67-1.70** con buenos rendimientos, excepto **1.70**.

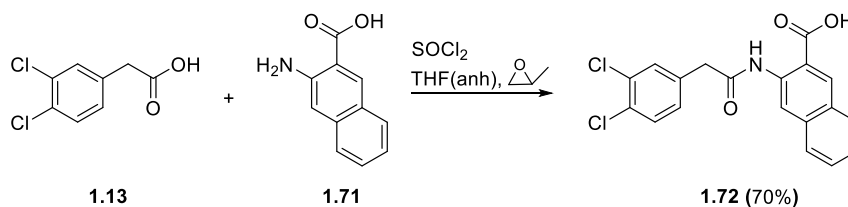
Tabla 1.7. Modificaciones estructurales en el patrón de sustitución del anillo B con respecto al prototipo **1.6**. Síntesis de los derivados **1.67-1.70**

| $ \begin{array}{ccc} \text{R}_A-\text{C}(=\text{O})\text{OH} & \xrightarrow[2. \text{NH}_2\text{R}_B (1.63-1.66), \text{THF}, \text{Et}_3\text{N}]{1. \text{SOCl}_2} & \text{R}_A-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}_B \\ \text{1.13} & & \text{1.67-1.70} \end{array} $ | | | | | |
|--|-------|-------|---|---|--------|
| ÁCIDO | AMINA | AMIDA | R _A | R _B | Rdto % |
| 1.13 | 1.63 | 1.67 |  |  | 94 |
| | 1.64 | 1.68 | |  | 96 |
| | 1.65 | 1.69 | |  | 72 |
| | 1.66 | 1.70 | |  | 34 |

D) Extensión del anillo aromático B

En el reconocimiento entre un ligando y una proteína las interacciones no covalentes que implican anillos aromáticos juegan un papel fundamental. Entre las formas de interacción en las que participan los anillos aromáticos, cabe destacar los apilamientos π - π o en T, las interacciones hidrófobas CH- π o enlaces de hidrógeno. Además, considerando la existencia de bolsillos hidrófobos voluminosos en la proteína DREAM, decidimos explorar la extensión del anillo aromático B, que permitiese mejorar la afinidad por DREAM. En base a estas premisas, se sustituyó el anillo de fenilo por un naftilo. Como se indica en el Esquema 1.9, el derivado de naftilo **1.72** se sintetizó por reacción entre el ácido 3,4-diclorofenilacético (**1.13**) con el ácido 2-aminonaftoico (**1.71**) siguiendo la metodología optimizada para la formación de

enlaces amida (Método C). Tras un proceso de purificación por trituración con éter como disolvente, se obtuvo el producto deseado **1.72** con un rendimiento del 70%.



Esquema 1.9. Síntesis del derivado **1.72**

1.4.2.3. Modificaciones en el espaciador

Adicionalmente, con la finalidad de determinar la importancia de la longitud y naturaleza del espaciador tipo amida para la interacción con DREAM, nos planteamos llevar a cabo distintas modificaciones a partir del cabeza de serie **1.6** (Figura 1.11). Estos cambios estructurales consistieron en el aumento de la longitud del espaciador de un grupo metileno a dos (**1.73**). A continuación, se estudiaron espaciadores de diferente naturaleza, seleccionándose un espaciador α,β -insaturado (**1.74**) y la sustitución del grupo carbonilo por un sulfonilo (**1.75**) o metileno (**1.76**).

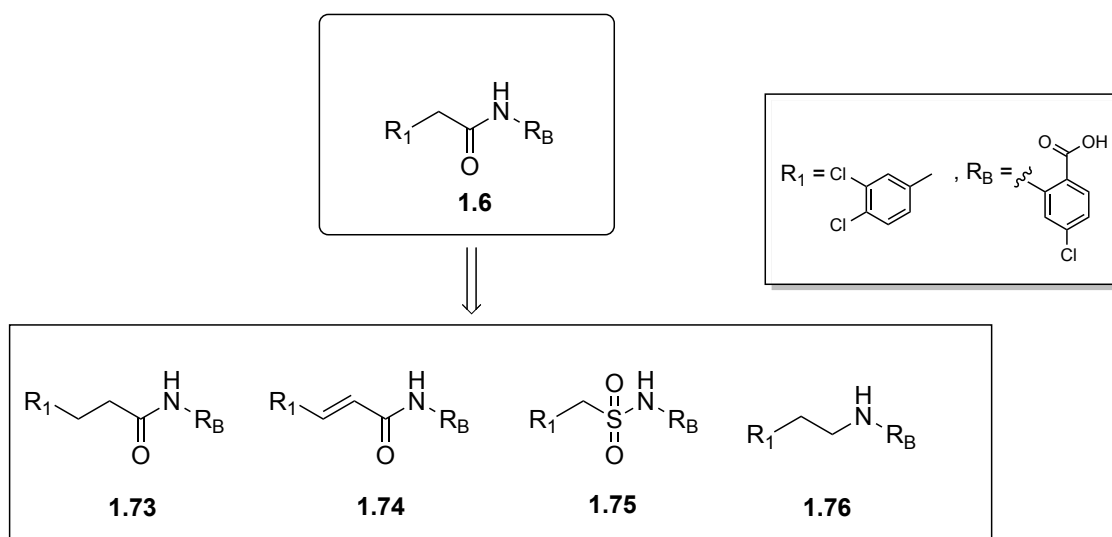
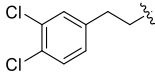
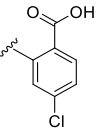
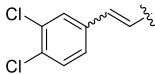


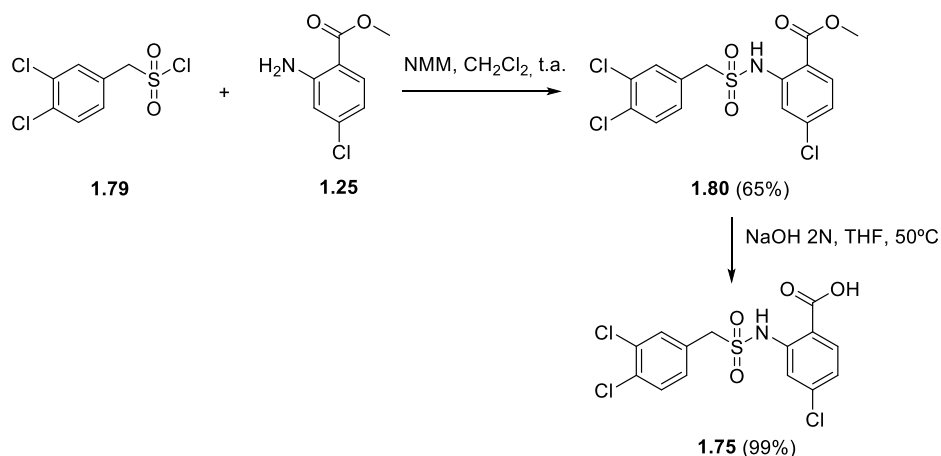
Figura 1.11. Modificaciones en el espaciador a partir de la estructura de **1.6**

La síntesis de las amidas **1.73** y **1.74** se llevó a cabo mediante el Método C (Tabla 1.7). El derivado **1.73**, portador de un espaciador amida con dos grupos metilenos, se obtuvo con buen rendimiento (72%). Sin embargo, cuando el ácido **1.78** se hizo reaccionar con la amina **1.10**, se obtuvo una mezcla de reacción compleja que se purificó mediante cromatografía de media presión en fase reversa, obteniéndose el compuesto **1.74**, portador de un espaciador α,β -insaturado, con bajos rendimientos. Además, en el espectro de RMN de **1.74** se observó la presencia de los isómeros E:Z en una relación 3:1.

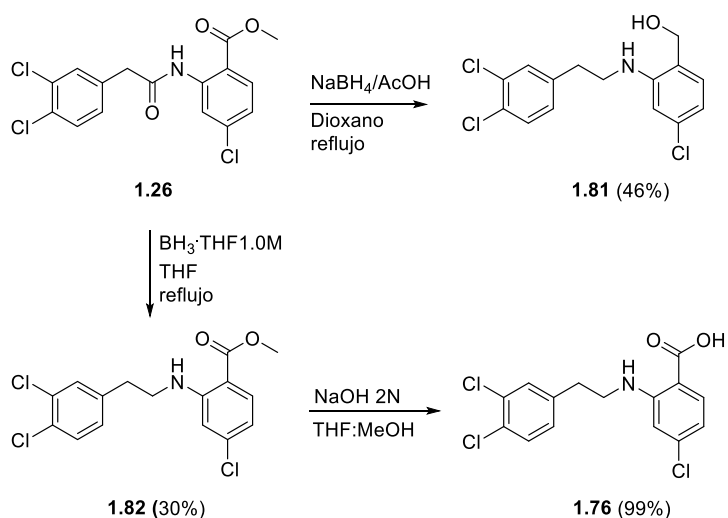
Tabla 1.8. Modificaciones estructurales en el espaciador. Síntesis de los derivados **1.73** y **1.74**

| $ \begin{array}{c} \text{R}_A\text{---COOH} \xrightarrow[2. \text{NH}_2\text{R}_B \text{ (1.10), THF, Et}_3\text{N}]{1. \text{SOCl}_2} \text{R}_A\text{---CONH---R}_B \\ \text{1.77-1.78} \hspace{15em} \text{1.73-1.74} \end{array} $ | | | | | |
|---|-------|-------|---|---|--------|
| ÁCIDO | AMINA | AMIDA | R _A | R _B | Rdto % |
| 1.77 | 1.10 | 1.73 |  |  | 72 |
| 1.78 | | 1.74 |  | | 12 |

Como se recoge en el Esquema 1.10, la reacción entre el 2-amino-4-clorobenzoato de metilo **1.25** y el cloruro de (3,4-diclorofenil)metanosulfonilo **1.79** en CH₂Cl₂ como disolvente y NMM como base, condujo a la sulfonamida **1.80** en forma de ester metílico con un rendimiento del 65%.²¹ A continuación, se llevó a cabo la saponificación de **1.80** con una disolución de NaOH 2N en THF a 50°C, obteniéndose el producto deseado **1.75** con un 99% de rendimiento, sin necesidad de purificaciones adicionales.

Esquema 1.10. Síntesis de la sulfonamida **1.75**

Con respecto a la preparación del derivado portador de un grupo amina en el espaciador **1.76**, inicialmente, se intentó llevar a cabo una reducción selectiva del grupo amida utilizando $\text{NaBH}_4/\text{AcOH}$ en dioxano.²² Sin embargo, el empleo de estas condiciones de reacción condujo a la reducción del éster metílico, dando lugar al aminoalcohol **1.81** (Esquema 1.11). Como alternativa a este método, se estudió la reducción de la amida por tratamiento de **1.26** con el complejo $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ 1M bajo atmósfera inerte de argón y a reflujo.²³ En estas condiciones se obtuvo el compuesto **1.82** con un 30% de rendimiento. Seguidamente, la saponificación del grupo éster con una disolución de NaOH 2N en una mezcla de THF:MeOH (2:1) como disolvente condujo a la amina **1.76**.

Esquema 1.11. Reducción del derivado **1.26** para la síntesis de **1.76**

1.4.2.4. Estudio de la capacidad de los compuestos sintetizados para interaccionar con DREAM. Relaciones estructura-actividad

La capacidad de los compuestos sintetizados para unirse a DREAM se evaluó mediante la técnica de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Estos ensayos se realizaron en la Unidad de SPR del Instituto de Química Médica con un equipo Biacore X100. El protocolo seguido para llevar a cabo el estudio fue el mismo que el descrito en la sección 1.4.1.2. En el Anexo 2 se recogen los fundamentos de la técnica.

En todos los casos se utilizó un chip CM5 con un nivel de inmovilización de GST-DREAM de ± 9000 RU. Los compuestos se evaluaron a una concentración de $5 \mu\text{M}$. Como control positivo se utilizaron CL-888 (**1.2**) y el cabeza de serie **1.6**, y como control negativo glibencamida (Gb, **1.4**). Para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos en los sensogramas, la capacidad de unión de los compuestos, expresada en unidades de resonancia (RU), se representa en diagrama de barras.

1.4.2.4.1. Modificaciones en el anillo A

Los resultados de la serie de amidas en las que se modifica la naturaleza y posición de los sustituyentes sobre el anillo A se recoge en la Figura 1.12.

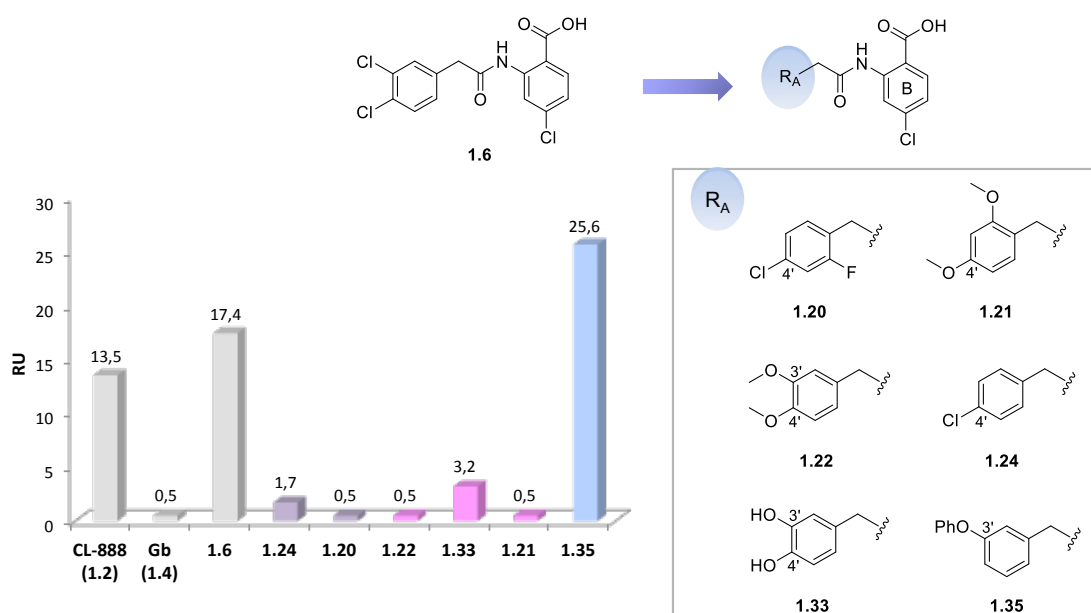


Figura 1.12. Influencia de las modificaciones realizadas en el anillo A (RA)

Los resultados de los estudios de SPR muestran que la eliminación del átomo de Cl en posición 3' (**1.24** y **1.20**) condujo a pérdida de la unión a DREAM, poniendo de manifiesto la importancia de este sustituyente. Por otra parte, la sustitución de los átomos de cloro en posiciones 3' y 4' por grupos hidroxilo o metoxilo respectivamente (**1.22** y **1.33**), así como la presencia de grupos metoxilo en posiciones 2' y 4' (**1.21**), condujo a pérdida de la actividad. Sin embargo, cuando el átomo de Cl en la posición 3' se sustituyó por un grupo fenoxilo y se eliminó el Cl en la posición 4' (**1.35**), se observó un incremento considerable en la capacidad de unión del ligando a DREAM. Estos resultados sugieren la importancia de un resto hidrófobo en posición 3' para la interacción con DREAM.

1.4.2.4.2. Modificaciones en el anillo B

En cuanto al anillo B, en una primera aproximación, éste se sustituyó por una serie de anillos aromáticos diferentemente sustituidos (**1.42-1.46**). Los datos de los estudios de SPR muestran que los compuestos presentan escasa o nula capacidad de interacción con DREAM (Figura 1.13). En comparación con el cabeza de serie **1.6**, esta pérdida de la unión se podría deber a la falta del grupo carboxilo y/o del átomo de cloro en el anillo B.

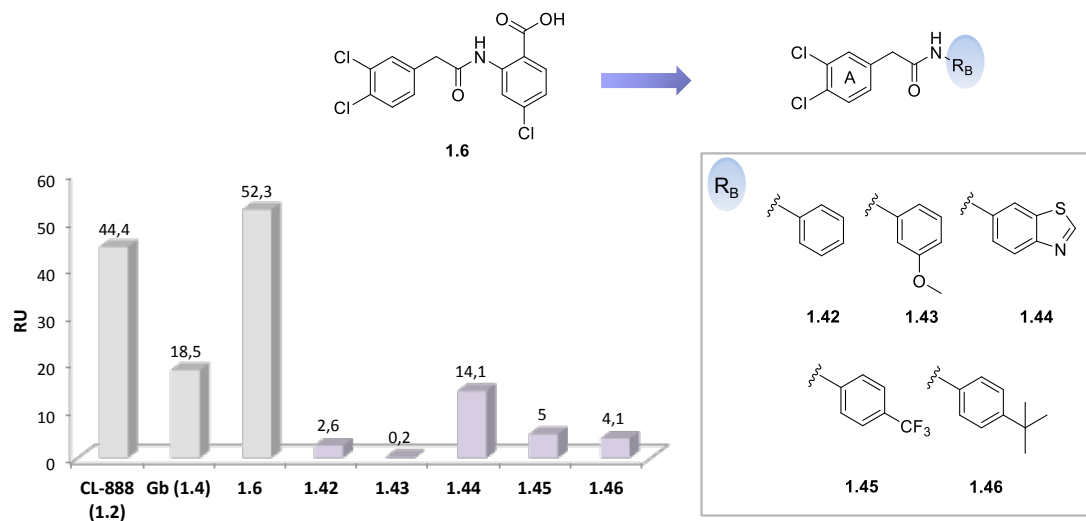


Figura 1.13. Influencia de la incorporación de anillos aromáticos con distintas sustituciones (R_B)

Con objeto de identificar el/los sustituyentes esenciales para la unión a DREAM, se prepararon una serie de derivados en los que se mantuvo el átomo de cloro, y el grupo carboxilo se sustituyó por un grupo metoxycarbonilo (**1.26**), fenoxycarbonilo (**1.48**) y metoxycarbonilo (**1.49**). La evaluación de estos derivados por SPR mostró que presentan una escasa o nula capacidad de interacción con DREAM (Figura 1.14). Estos resultados parecen indicar que la existencia del grupo carboxilo es esencial para mantener la unión a DREAM.

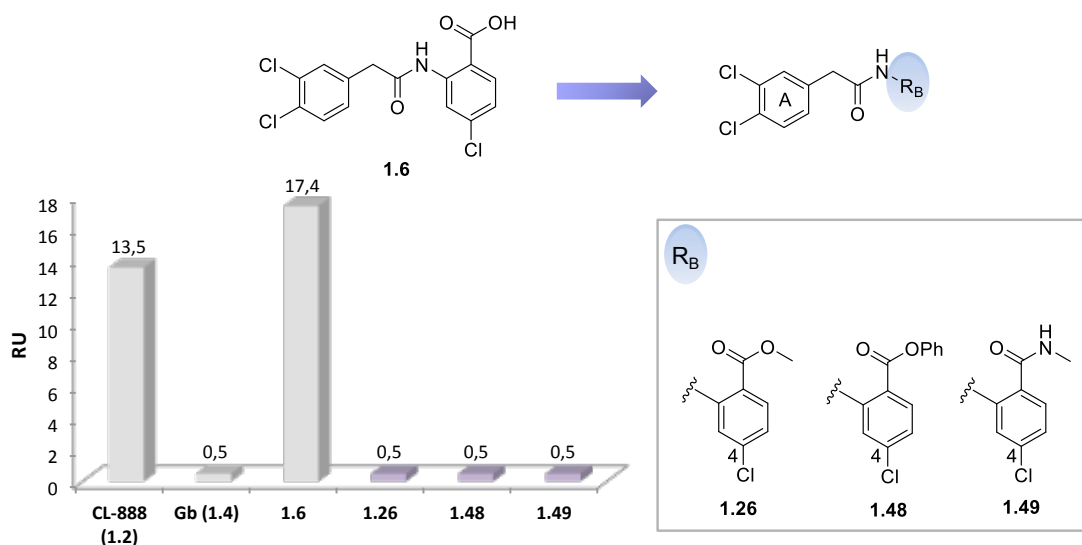


Figura 1.14. Análisis de la influencia de la modificación del grupo carboxilo del anillo B (R_B)

A continuación, se estudió la influencia de la posición del grupo carboxilo del anillo B. Como se muestra en la Figura 1.15, los resultados de los experimentos de SPR, indicaron que la posición del grupo carboxilo en el anillo aromático también es un factor determinante de la capacidad de unión. Así, la presencia del grupo carboxilo en posición *orto* al grupo amida es la más beneficiosa para la interacción con DREAM (derivado **1.6**). Por el contrario, cuando el grupo carboxilo se sitúa en *meta* al grupo amida (derivado **1.53**), se observó una disminución en la actividad, que se pierde completamente, cuando dicho grupo se encuentra en *para* al grupo amida (derivado **1.54**).

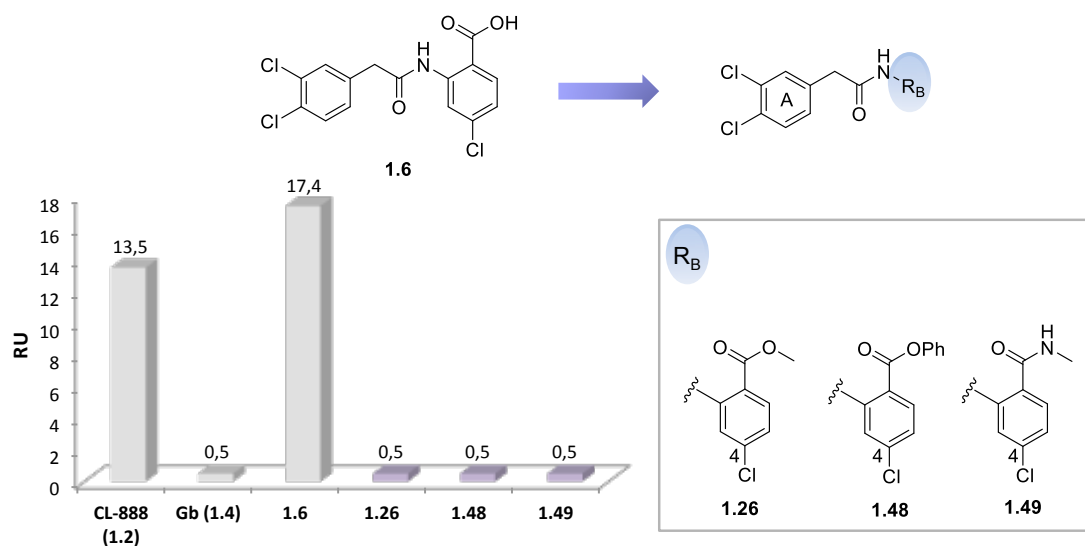


Figura 1.15. Análisis de la influencia de la posición del grupo carboxilo del anillo B en la unión a DREAM

En cuanto a la influencia de la naturaleza del sustituyente en posición 4 del anillo B en la actividad, se puede concluir que sólo la sustitución del átomo de Cl (derivado **1.6**) por un Br (derivado **1.62**), mantiene la capacidad de unión de los compuestos a DREAM (Figura 1.16).

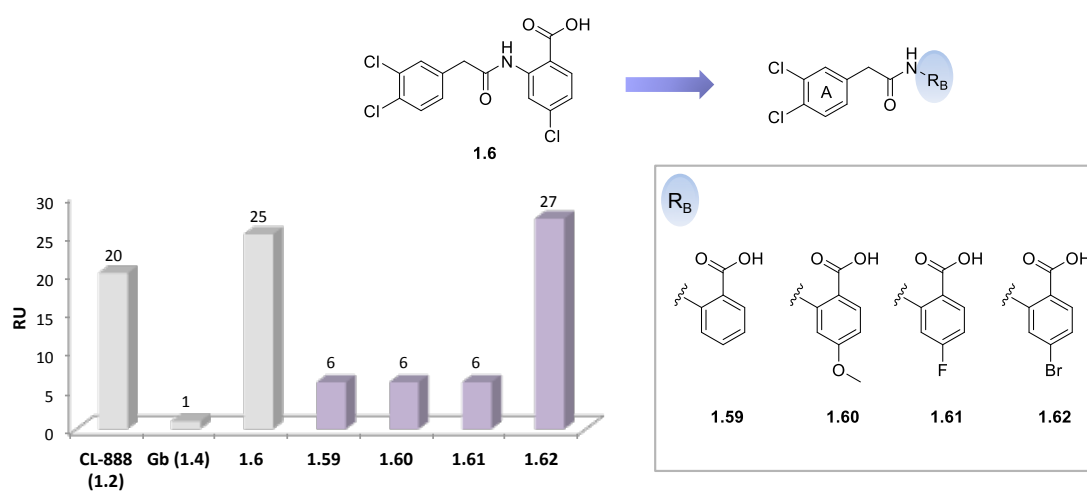


Figura 1.16. Análisis de la naturaleza del sustituyente en la posición 4 del anillo B

Con objeto de estudiar patrones de sustitución alternativos en el anillo B, con respecto al cabeza de serie **1.6**, se evaluaron los compuestos **1.67-1.70**. Los datos de los estudios de SPR se recogen en la Figura 1.17. A la vista de estos resultados, se puede concluir que las posiciones más favorables para la interacción con DREAM se corresponden con la presencia del grupo ácido en posición 1 y el halógeno en posición 5 (derivado **1.67**).

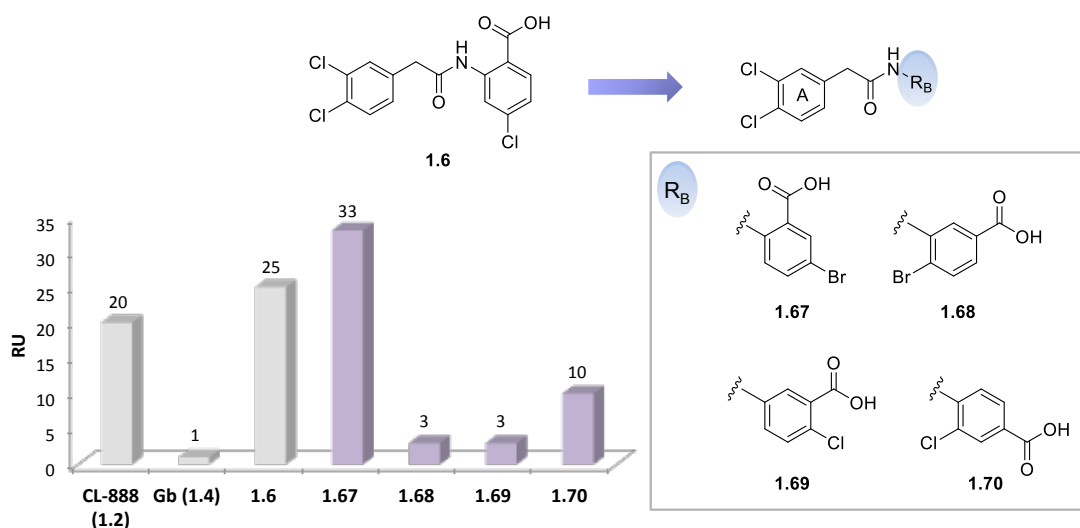


Figura 1.17. Influencia de distintos patrones de sustitución en el anillo B con respecto al cabeza de serie **1.6**

Finalmente, se evaluó la incorporación de un agrupamiento naftilo en el anillo B, lo que conlleva un aumento del área aromática. En la Figura 1.18 se recoge la respuesta obtenida para el derivado portador de un grupo naftilo en el anillo B (**1.72**). De los resultados de afinidad obtenidos se puede concluir que la capacidad de interacción del derivado **1.72** con DREAM es mayor que la respuesta obtenida para el cabeza de serie **1.6**. Estos resultados, junto con el efecto beneficioso de la presencia de un átomo de Cl o Br en posición 4 o 5 del anillo B, respectivamente, sugieren la existencia de un bolsillo hidrófobo en la proteína DREAM con el que interaccionan estos ligandos.

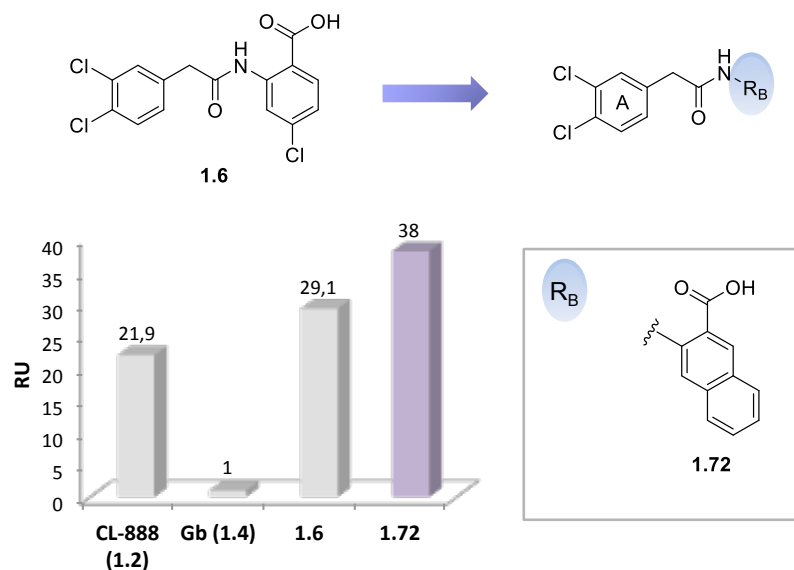


Figura 1.18. Influencia de la incorporación de un agrupamiento naftilo en el anillo B

1.4.2.4.3. Modificaciones en el espaciador

Las modificaciones introducidas en el espaciador que une las dos subunidades aromáticas suponen, por una parte, el aumento de un eslabón por incorporación de un grupo metileno (derivados **1.73-1.74**) y, por otra, la sustitución del grupo carbonilo del agrupamiento amida por un grupo sulfonilo o metileno (derivados **1.75-1.76**). Como se recoge en la Figura 1.19, la elongación en una unidad de dicho espaciador, manteniendo el agrupamiento amida, dió lugar a un aumento en la capacidad de interacción por DREAM (derivado **1.73**). Sin embargo, si en la elongación del espaciador se introduce un doble enlace (derivado **1.74**), la capacidad de unión a DREAM se mantiene en relación al prototipo **1.6**. Por otra parte, la sustitución del enlace amida por un agrupamiento sulfonamida (**1.75**) o su reducción a amina (**1.76**), dió lugar a una drástica pérdida de la capacidad de unión a DREAM. Estos resultados indican la importancia del grupo CO del agrupamiento amida.

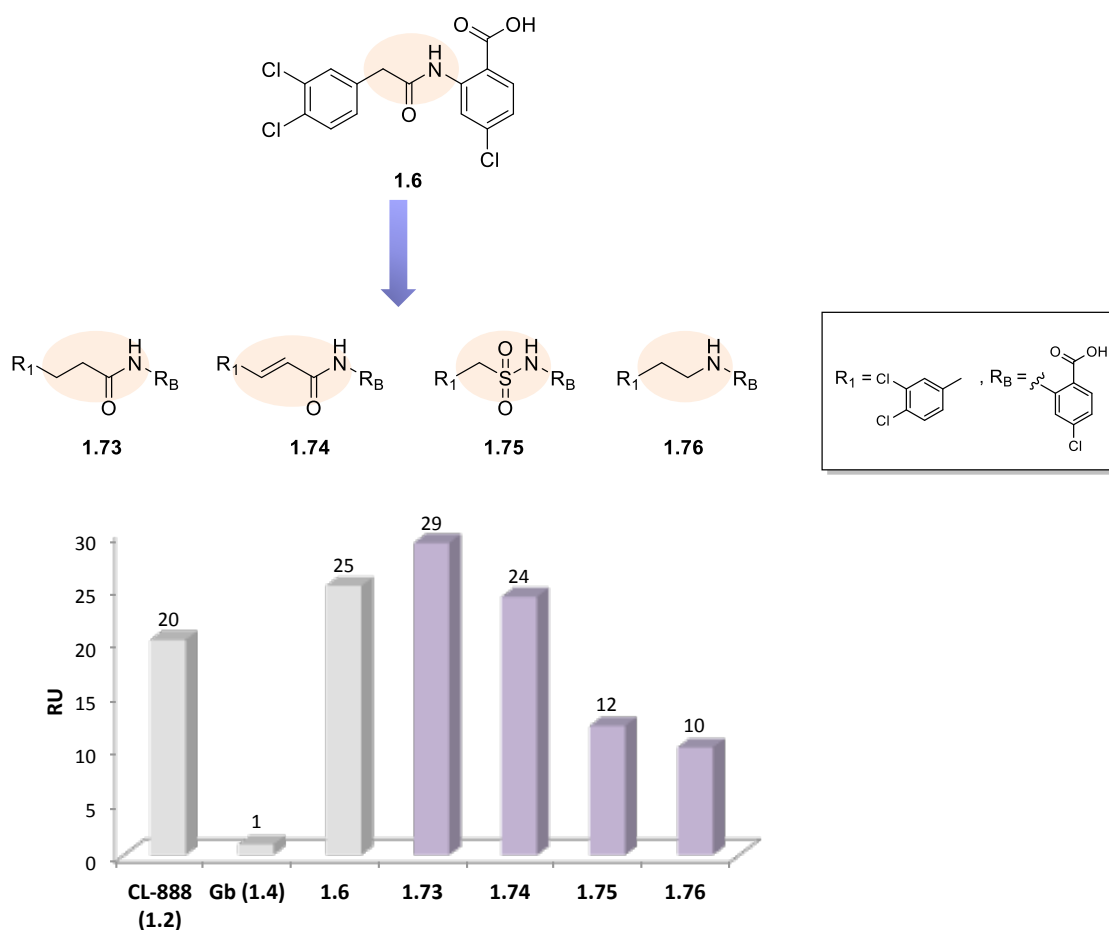


Figura 1.19. Análisis de la influencia de las modificaciones en el espaciador sobre la unión a DREAM

Del análisis preliminar de los datos de la evaluación de la capacidad de unión de los compuestos a DREAM se pueden extraer ciertas conclusiones de relaciones estructura-actividad, estableciéndose como necesarios los siguientes requisitos estructurales para la unión a DREAM (Figura 1.20):

- Un cloro o un grupo fenoxilo en posición 3' del anillo A.
- Un espaciador amida de longitud $n = 1,2$.
- La importancia del grupo carbonilo de la amida del espaciador.
- Un grupo carboxilo en el anillo B en posición orto con respecto al grupo amida.
- La posición 4 y/o 5 del anillo B debe de estar ocupada por un átomo de cloro, bromo o la fusión de un segundo anillo de benceno para formar el grupo naftaleno.

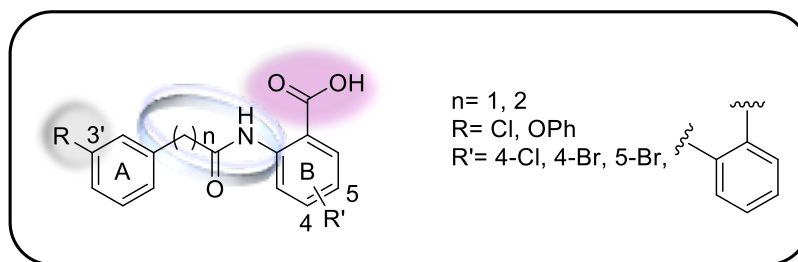


Figura 1.20. Análisis de relaciones estructura-actividad

Estos resultados han servido como base para orientar el diseño de nuevos compuestos con el fin de mejorar la interacción con DREAM y modular su función.

1.4.3. Nuevos derivados: Diseño, síntesis y evaluación biológica

A la vista de los resultados de las relaciones estructura-actividad iniciales ya comentadas, se planteó la preparación y el estudio de **1.83** y **1.84** que reunían las características óptimas para la interacción tanto en los anillos aromáticos como en el espaciador (Figura 1.21.A).

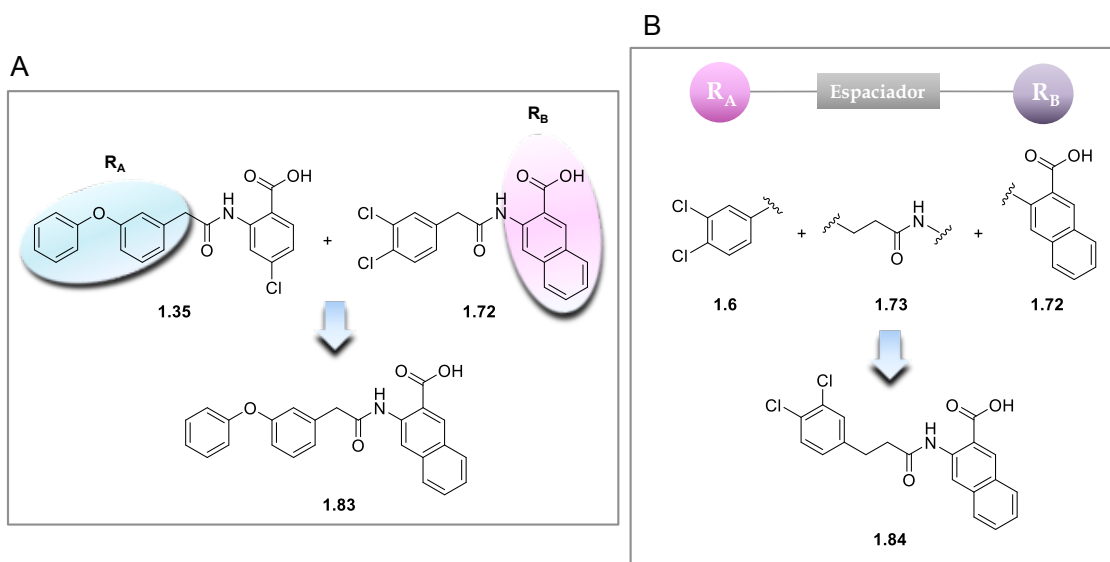


Figura 1.21. Estructura de los nuevos análogos **1.83** y **1.84**

Además, dados los buenos resultados obtenidos al introducir un grupo -OPh en el anillo A, se decidió explorar la incorporación de otros grupos aromáticos más voluminosos que el fenilo. En base a esto, se diseñaron los derivados **1.85-1.88** en los que el anillo A se sustituyó por un grupo naftilo (**1.85-1.86**) o por un grupo difenilmetilo (**1.87-1.88**). Además, en el análogo **1.88** se sustituyó el anillo B por un grupo naftilo (Figura 1.22). La capacidad de unión de estos compuestos a DREAM se evaluó también mediante la técnica de SPR. A continuación se detallan los resultados más relevantes.

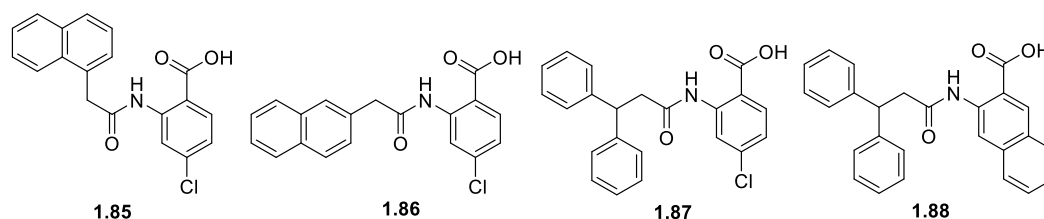


Figura 1.22. Diseño de nuevos derivados con aumento del carácter y volumen aromático

1.4.3.1. Síntesis de los nuevos derivados 1.83-1.88

La preparación de los nuevos derivados se llevó a cabo siguiendo la metodología optimizada para la síntesis de amidas (Método C, Tabla 1.2). Como se muestra en la Tabla 1.9, los derivados **1.83-1.88** se obtuvieron por tratamiento de los correspondientes ácidos y aminas en presencia de cloruro de tionilo (SOCl_2), óxido de propileno y THF anhidro como disolvente. El bajo rendimiento obtenido para **1.87** se debió a las dificultades en el proceso de aislamiento.

Tabla 1.9. Rendimientos obtenidos en la síntesis de los derivados 1.83-1.88

| <div style="text-align: center;"> <p> $R_A-COOH \xrightarrow[2. NH_2R_B (1.71, 1.10, 1.70), THF, Et_3N]{1. SOCl_2} R_A-CO-NH-R_B$ </p> <p> 1.30, 1.77, 1.89-1.91 1.83-1.88 </p> </div> | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|--------|
| ÁCIDO | AMINA | AMIDA | R_A | R_B | Rdto % |
| 1.30 | 1.71 | 1.83 | | | 61 |
| 1.77 | | 1.84 | | | 77 |
| 1.89 | 1.10 | 1.85 | | | 70 |
| 1.90 | | 1.86 | | | 66 |
| 1.91 | | 1.87 | | | 33 |
| 1.91 | 1.71 | 1.88 | | | 74 |

1.4.3.2. Evaluación biológica de los nuevos derivados 1.83-1.88

1.4.3.2.1. Determinación de la unión de los nuevos derivados 1.83-1.88 a DREAM mediante SPR

El protocolo seguido para evaluar la capacidad de unión de las amidas **1.83-1.88** a DREAM mediante SPR fue el mismo que el descrito en los apartados anteriores.

En la Figura 1.23 se muestra en un diagrama de barras la capacidad de unión a DREAM, expresada en unidades de resonancia (RU), para cada uno de los nuevos derivados **1.83-1.88** y sus correspondientes prototipos de partida **1.35, 1.72** y **1.73**.

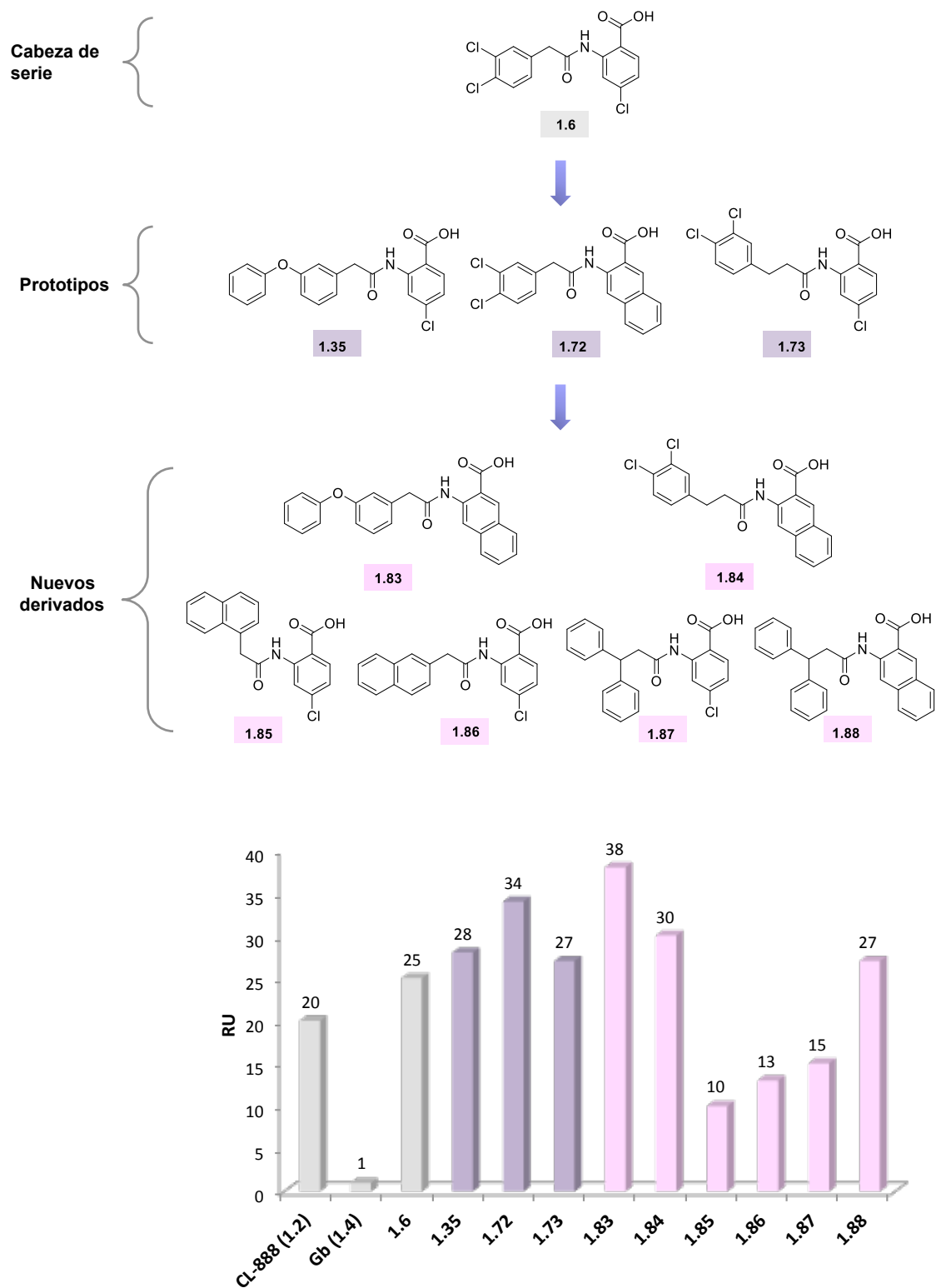


Figura 1.23. Respuestas en RU de los prototipos 1.35, 1.72 y 1.73 y de sus análogos 1.83-1.88.

Como se ha indicado anteriormente, un aumento del área aromática en el anillo B conduce a un incremento en la capacidad de unión de los compuestos a DREAM. Este hecho se corrobora si se comparan los valores obtenidos para **1.83**, **1.84** y **1.88** en relación con sus prototipos de partida **1.35**, **1.72** y **1.87**, respectivamente. En cuanto al anillo A, los nuevos derivados (**1.85-1.88**) mostraron una disminución en la capacidad de unión a DREAM con respecto a los prototipos. Esta disminución fue más acusada en el caso de los derivados portadores del grupo naftilo en el anillo A (**1.85** y **1.86**) que presentan una menor flexibilidad conformacional.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó el derivado **1.83**, que presentó la mayor capacidad de interacción con DREAM, para estudiar su efecto en la modulación del complejo Kv4.3/DREAM.

1.4.3.2.2. Efecto del derivado **1.83** en la modulación del complejo Kv4.3/DREAM

Como se comentó en la introducción, DREAM se comporta como un componente integral de los complejos que conforman los canales de potasio Kv4 y, por tanto, puede participar en la regulación de la corriente transitoria tipo A (I_{SA}). En las células neuronales, las corrientes I_{SA} , se concentran en la membrana somatodendrítica donde tiene lugar la respuesta postsináptica, se modula la excitabilidad dendrítica y la plasticidad neuronal a través del potencial de acción. En este sentido, compuestos que interactúen con Kv4 y en particular con Kv4.3, podrían ser de utilidad en la prevención y/o tratamiento de desórdenes del sistema nervioso tales como epilepsia, traumatismo cerebral, lesión de la espina dorsal, insomnio, en la enfermedad de Alzheimer, en la enfermedad de Parkinson, encefalomielitis, esclerosis múltiple y ansiedad.²⁴

En base a estos precedentes, se evaluó el efecto funcional del derivado **1.83** sobre la corriente generada por los canales Kv4.3 ensamblados o no con DREAM. Para ello, se analizaron las características electrofisiológicas, mediante la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (*Patch-clamp*), de las corrientes generadas por Kv4.3 y el complejo Kv4.3/DREAM en ausencia (situación control) y en presencia del compuesto **1.83**. Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio dirigido por la Dra. Carmen Valenzuela del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBM, CSIC-UAM). En el anexo 1, se recogen los fundamentos de la técnica.

En la Figura 1.24.A se muestran las curvas concentración-efecto bloqueante del derivado **1.83** sobre los canales Kv4.3 y Kv4.3/DREAM en un rango de concentraciones de 0.01-100 μ M. De este análisis, se puede concluir que el compuesto **1.83** bloquea los

canales $K_V4.3$ y $K_V4.3/DREAM$ de forma concentración dependiente, siendo el bloqueo mayor en ausencia de DREAM. El ajuste de los valores obtenidos a la ecuación de Hill $= 1 / [1 + (CI_{50} / [F])^{n_H}]$ permitió obtener un valor de CI_{50} para **1.83** de $6.8 \mu M$ y un $n_H=0.73$ para $K_V4.3$, y de $12.1 \mu M$ y un $n_H=0.75$ para $K_V4.3/DREAM$. Cuando el coeficiente de Hill se ajustó a la unidad, se obtuvieron valores similares a los experimentales, lo que indicó que la unión de **1.83** al canal no presenta cooperatividad, es decir, la unión de una molécula a la proteína no favorece la unión de la siguiente. Teniendo en cuenta los valores de CI_{50} obtenidos, se empleó una concentración de $5 \mu M$ y $10 \mu M$ para analizar el grado de bloqueo producido por **1.83** sobre los canales $K_V4.3$ y $K_V4.3/DREAM$ respectivamente. Como se muestra en la Figura 1.24.B, en ambos casos el bloqueo fue significativamente mayor cuando se midió en el pico máximo que

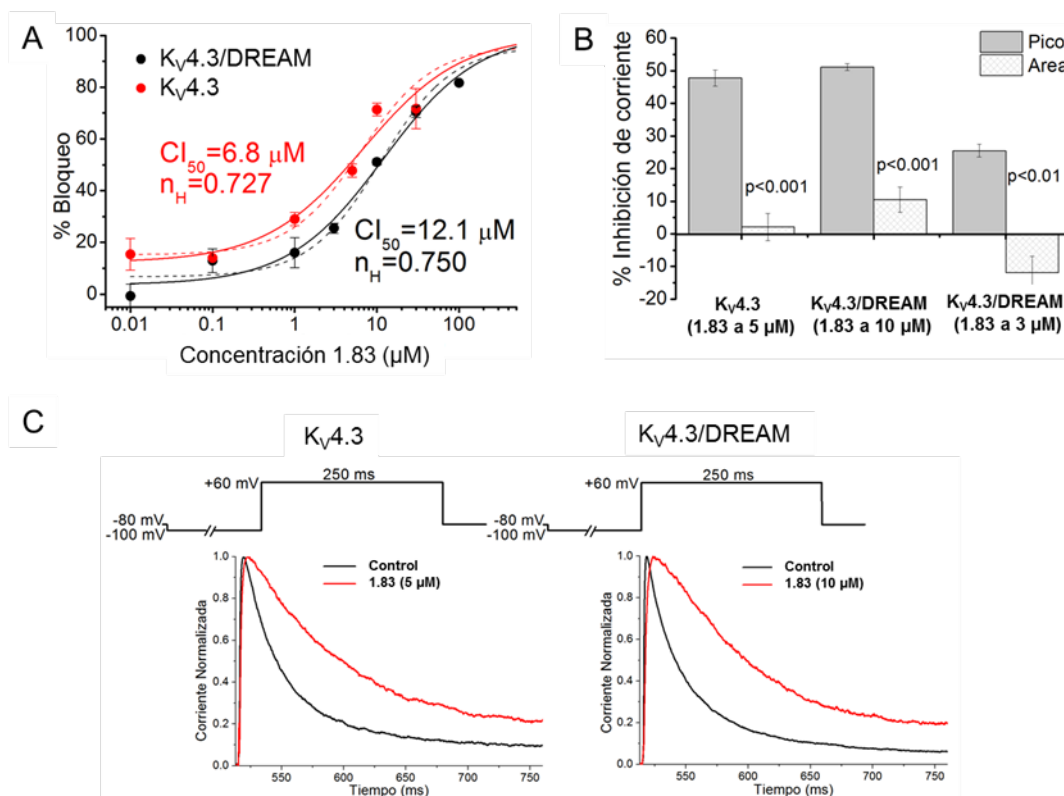


Figura 1.24. A: Curva dosis respuesta del compuesto **1.83** (línea continua) en los canales $K_V4.3$ y $K_V4.3/DREAM$. La línea discontinua se corresponde a un ajuste con un n_H fijado a 1. B: Porcentaje de bloqueo producido por **1.83** en los canales $K_V4.3$ y $K_V4.3/DREAM$ medido a la amplitud máxima de la corriente y en la carga (medida como el área de la corriente durante la aplicación de un pulso de 250 ms a $+60$ mV), utilizando concentraciones cercanas a las CI_{50} en cada caso ($n = 11-14$, $p < 0.001$). C: Inactivación de los canales $K_V4.3$ y $K_V4.3/DREAM$ en ausencia y en presencia de **1.83** tras aplicar el protocolo de pulsos mostrado en la parte superior de la Figura

cuando se realizó la medida en función de la carga. Esto se puede explicar por la ralentización de la inactivación de la corriente que origina el derivado **1.83** (Figura 1.24.C). Además, cuando se llevó a cabo el estudio a menores concentraciones, 3 μM para $K_V4.3/\text{DREAM}$, se pudo observar un aumento de la carga del $12\% \pm 4.9$ para $n=4$ experimentos, indicando que el derivado **1.83** presenta un efecto agonista a bajas concentraciones.

El efecto de **1.83** sobre la cinética de activación (τ_{act}), inactivación (τ_f y τ_s) y recuperación de la inactivación (τ_{rec}) se recoge en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9. Efectos del derivado **1.83** (5 y 10 μM para $K_V4.3$ y $K_V4.3/\text{DREAM}$ respectivamente) sobre la cinética de activación, de inactivación y de recuperación de la inactivación en $K_V4.3$ y $K_V4.3/\text{DREAM}$

| Entrada | | $K_V4.3$ | $K_V4.3 + 1.83$ | $K_V4.3/\text{DREAM}$ | $K_V4.3/\text{DREAM} + 1.83$ |
|---------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---|--|
| ACTIVACIÓN | | | | | |
| 1 | τ_{act} (ms) +60 mV | 0.73 ± 0.09 | $1.9 \pm 0.32^*$ | 0.68 ± 0.12 | $2.5 \pm 0.55^*$ |
| INACTIVACIÓN | | | | | |
| 2 | τ_f (ms) | 22.2 ± 4.9 | $59.7 \pm 7.8^{**}$ | 30.1 ± 3.8 | $64.2 \pm 7.4^{**}$ |
| 3 | τ_s (ms) | 174.6 ± 66.4 | 450.2 ± 133.4 | 170.4 ± 18.7 | $436.1 \pm 81.4^*$ |
| RECUPERACIÓN | | | | | |
| 4 | τ_{rec} (ms) | 76.5 ± 12.7 | 118.5 ± 23.8 | 46.2 ± 10.0 | 163.1 ± 22.4 |

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; diferencias significativas en ausencia y en presencia de **1.83**

El análisis de los resultados muestra que la unión del derivado **1.83** a los canales $K_V4.3$ y $K_V4.3/\text{DREAM}$ retrasa tanto la cinética de activación como la de inactivación. Así, la cinética de activación se retrasa 2.6 veces para $K_V4.3$ ($n=8$, $p < 0.01$) y 3.6 veces para $K_V4.3/\text{DREAM}$ ($n=6$, $p < 0.05$); la constante de inactivación rápida (τ_f) se enlentece 2.7 veces y la constante de inactivación lenta (τ_s) 2.6 veces para $K_V4.3$ ($n=3$, $p < 0.01$); mientras que para $K_V4.3/\text{DREAM}$ ($n=4$, $p < 0.05$) se retrasa 2.1 y 2.5 veces respectivamente.

En cuanto a la cinética de recuperación de la inactivación, se observa un efecto importante por la presencia de **1.83** en los canales $K_{V4.3}$ /DREAM, donde la τ_{rec} aumentó 3.5 veces ($n = 5$, $p < 0.01$), sin verse modificada en ausencia de DREAM.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el derivado **1.83** presenta un gran interés debido al efecto agonista mostrado tanto en $K_{V4.3}$ como en $K_{V4.3}$ /DREAM a concentraciones inferiores a la CI_{50} . A estas concentraciones, el retraso de la cinética de inactivación hace que se genere un mayor paso de la corriente total a través del canal y por tanto, que se produzca un aumento de la carga. Este efecto es mayor a concentraciones a las que el bloqueo de la corriente medida al pico máximo es pequeño, pero suficientemente alta como para que se haya producido la interacción proteína-ligando. Además, **1.83** se une al canal y el hecho de que la CI_{50} disminuya en presencia de DREAM podría ser debido a que el compuesto se une tanto al canal como a DREAM o a que la unión del compuesto pudiera facilitar la formación del complejo $K_{V4.3}$ /DREAM.

El derivado **1.83**, junto al compuesto NS5806 (**1.3**), son los únicos activadores de la corriente generada por $K_{V4.3}$, en presencia o ausencia de DREAM, conocidos hasta la fecha. La importancia de estos resultados estriba en que en ciertas patologías neuronales (epilepsia, esquizofrenia, ansiedad, dolor, etc)²⁵ y cardíacas (arritmias)²⁶ se produce un incremento de la frecuencia de disparo del potencial de acción, de manera, que las condiciones iniciales solo se restablecerían mediante el efecto producido por un activador de la corriente generada por los canales K_V .

1.5. CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes del presente Capítulo, centrado en el diseño, síntesis y evaluación biológica de la primera quimioteca de ligandos de DREAM como herramientas farmacológicas para el estudio de su interactoma, conducen a las siguientes conclusiones:

1.- Se ha identificado un cabeza de serie a partir del cual se ha desarrollado un proceso de optimización mediante la incorporación de diversas modificaciones estructurales. La posterior evaluación biológica de los compuestos preparados mediante resonancia de plasmón de superficie, ha permitido definir los requisitos estructurales más relevantes para incrementar la capacidad de unión de los ligandos a la proteína DREAM, entre las que destacan:

- Un cloro o un grupo fenoxilo en posición 3' del anillo A.
- Un espaciador de tipo amida con uno o dos grupos metilenos ($n = 1$ o 2).
- Un grupo carboxilo en el anillo B en posición orto con respecto al grupo amida.
- La posición 4 y/o 5 del anillo B debe de estar ocupada por un átomo de cloro, bromo o la fusión de un segundo anillo de benceno para formar el grupo naftaleno.

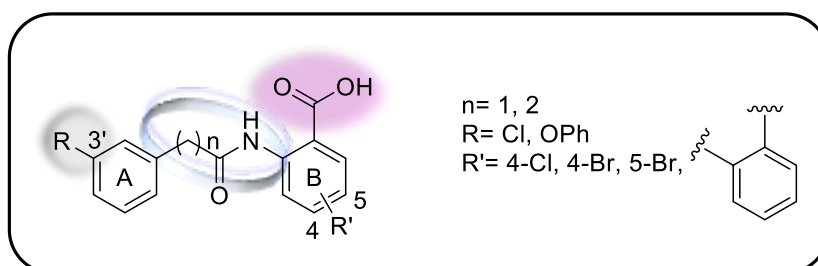


Figura 1.25. Requisitos estructurales clave para la interacción con DREAM

Estos resultados sugieren la existencia de un bolsillo hidrófobo en la proteína DREAM con el que interaccionan estos ligandos. Este bolsillo englobaría dos sitios hidrófobos que albergarían a los anillos A y B de los ligandos.

2.- Se ha estudiado el efecto funcional del mejor ligando desarrollado en este capítulo, **1.83**, en la modulación del complejo K_v4.3/DREAM. Los estudios de electrofisiología han permitido identificar al compuesto **1.83** como un activador de la corriente generada por los canales K_v4.3 a concentraciones inferiores a su CI₅₀. El derivado **1.83**, junto al compuesto NS5806 (**1.3**), son los únicos activadores de dicha corriente conocidos hasta la fecha.

1.6. BIBLIOGRAFÍA

1. Buxbaum, J. D.; Choi, E.-K.; Luo, Y.; Lilliehook, C.; Crowley, A. C.; Merriam, D. E.; Wasco, W. Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1177-1181.
2. Grell, W.; Greischel, A.; Zahn, G.; Mark, M.; Knorr, H.; Rupprecht, E.; Mueller, U. Preparation and formulation of (S)-(+)-2-ethoxy-4-[N-[1-(2-piperidinophenyl)-3-methyl-1-butyl]aminocarbonylmethyl]benzoic acid. HR9400769A2, 1997.
3. Mark, M.; Grell, W. Hypoglycaemic effects of the novel antidiabetic agent repaglinide in rats and dogs. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *121*, 1597-1604.
4. Calvo, J. M.; Lima, E. M. Repaglinida, un nuevo antidiabético oral. *MEDIFAM* **2001**, *11*, 331-334.
5. Okada, M.; Takezawa, D.; Tachibanaki, S.; Kawamura, S.; Tokumitsu, H.; Kobayashi, R. Neuronal calcium sensor proteins are direct targets of the insulinotropic agent repaglinide. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 87-97.
6. Salituro, F. G.; Bemis, G. W.; Green, J.; Kofron, J. L. Preparation of urea derivatives as inhibitors of p38. WO9900357A1, **1999**.
7. Bowlby, M. R.; Chanda, P.; Edris, W.; Hinson, J.; Jow, F.; Katz, A. H.; Kennedy, J.; Krishnamurthy, G.; Pitts, K.; Ryan, K.; Zhang, H.; Greenblatt, L. Identification and characterization of small molecule modulators of KChIP/Kv4 function. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6112-6119.
8. Calloe, K.; Cordeiro, J. M.; Di, D. J. M.; Hansen, R. S.; Grunnet, M.; Olesen, S. P.; Antzelevitch, C. A transient outward potassium current activator recapitulates the electrocardiographic manifestations of Brugada syndrome. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 686-694.
9. Calloe, K.; Soltysinska, E.; Jespersen, T.; Lundby, A.; Antzelevitch, C.; Olesen, S.-P.; Cordeiro, J. M. Differential effects of the transient outward K⁺ current activator NS5806 in the canine left ventricle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *48*, 191-200.
10. Lundby, A.; Jespersen, T.; Schmitt, N.; Grunnet, M.; Olesen, S. P.; Cordeiro, J. M.; Calloe, K. Effect of the Ito activator NS5806 on cloned Kv4 channels depends on the accessory protein KChIP2. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 2028-2044.

11. Witzel, K.; Fischer, P.; Baehring, R. Hippocampal A-type current and Kv4.2 channel modulation by the sulfonylurea compound NS5806. *Neuropharmacology* **2012**, *63*, 1389-1403.
12. Gonzalez, W. G.; Pham, K.; Miksovska, J. Modulation of the Voltage-gated Potassium Channel (Kv4.3) and the Auxiliary Protein (KChIP3) Interactions by the Current Activator NS5806. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 32201-32213.
13. (a) Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. Heterocyclic Peptide Backbone Modifications in an α -Helical Coiled Coil. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366-15367; (b) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137; (c) Pedersen, D. S.; Abell, A. 1,2,3-Triazoles in peptidomimetic chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2399-2411.
14. Valgeirsson, J.; Nielsen, E. O.; Peters, D.; Varming, T.; Mathiesen, C.; Kristensen, A. S.; Madsen, U. 2-Arylureidobenzoic Acids: Selective Noncompetitive Antagonists for the Homomeric Kainate Receptor Subtype GluR5. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5834-5843.
15. Garner, A. L.; Gloeckner, C.; Tricoche, N.; Zakhari, J. S.; Samje, M.; Cho-Ngwa, F.; Lustigman, S.; Janda, K. D. Design, Synthesis, and Biological Activities of Closantel Analogues: Structural Promiscuity and Its Impact on *Onchocerca volvulus*. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3963-3972.
16. (a) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064; (b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
17. Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V. One-Pot Synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles from in situ generated azides. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3897-3899.
18. Shao, C.; Wang, X.; Xu, J.; Zhao, J.; Zhang, Q.; Hu, Y. Carboxylic acid-promoted copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7002-7005.
19. Bertelli, L.; Biagi, G.; Giorgi, I.; Livi, O.; Manera, C.; Scartoni, V.; Lucacchini, A.; Giannaccini, G.; Barili, P. L. Substituted 1,2,3-triazolo[1,5-a]quinazolines: synthesis and binding to benzodiazepine and adenosine receptors. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 333-341.
20. Paladini, A. A.; Silva, J. L.; Weber, G. Slab gel electrophoresis of oligomeric proteins under high hydrostatic pressure. I. Description of the system and demonstration of the pressure dissociation of a dimer. *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 358-364.
21. Gobo, N. R. S.; Brocksom, T. J.; Zukerman-Schpector, J.; de Oliveira, K. T. Synthesis of an Octa-tert-butylphthalocyanine: A Low-Aggregating and Photochemically Stable Photosensitizer. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *23*, 5028-5031.
22. Shin, Y.-G.; Park, H.-J.; Lee, H.; Yoon, S.-H. A new route of synthesis of 5-(N-phenethylamino)salicylic acid derivatives by rapid and selective reduction of the amide group with NaBH₄/acetic acid. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 1822-1829.

23. Martinez, R. F.; Araujo, N.; Jenkinson, S. F.; Nakagawa, S.; Kato, A.; Fleet, G. W. J. (3R,4S,5R,6R,7S)-3,4,5,7-Tetrahydroxyconidine, an azetidine analogue of 6,7-diepicastanospermine and a conformationally constrained d-deoxyaltronojirimycin, from L-arabinose. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4813-4819.
24. Blom, P.; Defert, O.; Kaletta, T.; Leysen, D. C. M. Compounds that interact with ion channels, in particular with ion channels from the K_V family. WO 2007138112 A2.
25. Wulff, H.; Castle, N. A.; Pardo, L. A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 982-1001.
26. Huo, R.; Sheng, Y.; Guo, W.-T.; Dong, D. L. The potential role of Kv4.3 K⁺ channel in heart hypertrophy. *Channels* **2014**, *8*, 20320-9.

CAPÍTULO 2

**Diseño asistido por ordenador y síntesis de nuevos
ligandos de DREAM como potenciales moduladores de
K_v4.3/DREAM y ATF6/DREAM. Aplicación a la
Enfermedad de Huntington**

2.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado en la Introducción General, el sensor neuronal de calcio DREAM es una proteína multifuncional identificada también como KChIP3 y calsenilina.¹ Estructuralmente, DREAM posee una cadena polipeptídica de 256 aminoácidos; presenta una región N-terminal y otra C-terminal, donde se encuentran las cuatro *manos-EF* características de los NCS (Figura 2.1).²

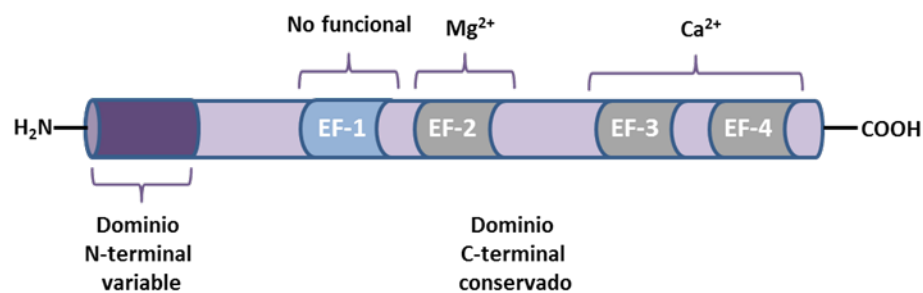


Figura 2.1. Estructura de la cadena polipeptídica de DREAM. La región N-terminal (morado) es un dominio variable dentro de la familia de los NCS. El dominio C-terminal (violeta) está formado por las cuatro manos-EF (EF-1 (azul) no es funcional, EF-2 (gris) une Mg²⁺ y EF-3, EF-4 (gris) se unen a Ca²⁺)

La región C-terminal de DREAM, al igual que la del resto de los miembros de los NCS, presenta un plegamiento globular organizado en dos dominios, uno formado por las manos EF-1 y EF-2, y el otro por las manos EF-3 y EF-4.³ Cada mano EF contiene dos hélices unidas por un bucle, donde se localizan los residuos que participan en la coordinación con el metal. Un rasgo característico de DREAM, y del resto de la familia de los NCS, es que la región EF-1 no es funcional. Esto es debido a la secuencia CPXG (Cys104 y Pro105) que impide la unión a Ca²⁺. En la mano EF-2, la presencia de un residuo de aspártico en la posición 12 del bucle (Asp150), en vez de glutámico, hace que este sitio presente más afinidad por Mg²⁺ que por Ca²⁺. Finalmente, las manos EF-3 y EF-4 unen Ca²⁺ con gran afinidad.⁴

Hasta la fecha la estructura cristalina de DREAM, aislada o en complejo con otras proteínas, no ha sido resuelta. Sin embargo, mediante técnicas de RMN se ha determinado, la estructura 3D de las manos EF-3 y EF-4 de DREAM humana (hDREAM, homo sapiens, código pdb 2E6W)⁵ y de las cuatro manos EF de la proteína DREAM de ratón (rDREAM, mus musculus, código pdb 2JUL)⁶, un mamífero euterio que posee un genoma similar al de los seres humanos, y cuya secuencia de aminoácidos presenta un 91% de identidad con la proteína humana. Por otra parte, se conoce la estructura de rayos X de dos miembros de la familia de KChIPs: la de KChIP1 (código pdb 1S1E)⁷, que muestra una disposición de las hélices muy similar a la estructura de RMN de rDREAM (código pdb 2JUL); y la de KChIP4a (código pdb 3DD4)⁸, que presenta una disposición de las hélices α del extremo N-terminal muy diferente a las estructuras descritas para KChIP1 y rDREAM. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios orientados a explicar cómo la formación del complejo $K_v4/KChIP$ modifica los niveles de expresión, la cinética de activación, inactivación y/o de recuperación de la inactivación del canal $K_v4.x$.⁹ En este sentido, se han determinado dos estructuras 3D de KChIP1 unido al extremo N-terminal del canal $K_v4.3$ (códigos pdb 2NZO y 2I2R)^{9b, 10}, y otra estructura en complejo con la hélice N-terminal del canal $K_v4.2$ (código pdb 1S6C)¹¹. Con respecto a la interacción de DREAM con ATF6, en la actualidad, no se conocen los detalles estructurales que describan cómo tiene lugar la formación de dicho complejo.

2.1.1. Estructura de RMN de DREAM de ratón

En el año 2007, se describió la estructura tridimensional de las manos EF-3 y EF-4 de hDREAM unidas a Ca^{2+} (código pdb 2E6W) mediante estudios de RMN.⁵ Un año después, se resolvió la estructura 3D por RMN de toda la región C-terminal de rDREAM unida a Ca^{2+} (código pdb 2JUL)⁶. Estos estudios revelaron que rDREAM presenta un plegamiento globular similar al de otros miembros de la familia de los NCS. Como se muestra en la Figura 2.2, la región C-terminal de rDREAM empieza en el residuo 78 y contiene dos dominios formados por cuatro *manos-EF*, donde EF-1 y EF-2 forman un domino, y EF-3 y EF-4 el otro. Esta región presenta un total de 10 hélices α y cuatro hojas β : H1 (residuos 78-85), H2 (residuos 90-103), H3 (residuos 111-120), H4 (residuos 128-138), H5 (residuos 148-159), H6 (residuos 163-174), H7 (residuos 184-198), H8 (residuos 211-222), H9 (residuos 232-240), H10 (residuos 243-254), β 1 (residuos 108-110), β 2 (residuos 145-147), β 3 (residuos 161-163), and β 4 (residuos 229-231).

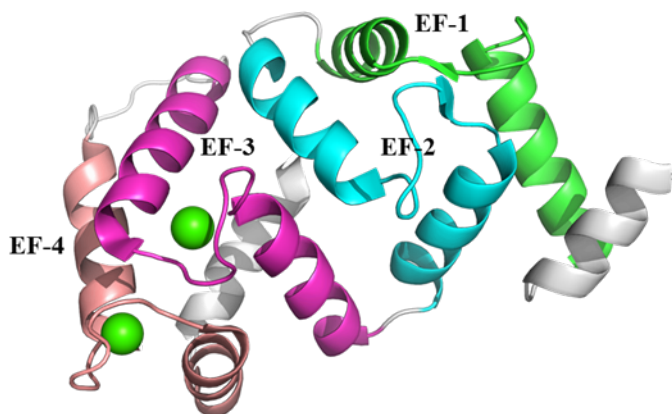


Figura 2.2. Estructura de RMN de rDREAM (código pdb 2JUL). La región C-terminal contiene un dominio constituido por EF-1 (verde) y EF-2 (ciano), y otro capaz de unir Ca^{2+} (esferas verdes) formado por EF-3 (rosa) y EF-4 (salmón)¹²

El análisis de la estructura de RMN de rDREAM ha revelado que la interfaz entre los dos dominios de mano EF se estabiliza por interacciones entre los residuos Tyr130, Phe133, Leu134 y Ala137 de la mano EF-2, y los de Leu173, Ile190 y Met197 de la mano EF-3 (Figura 2.3.B). Por otra parte, los aminoácidos de las manos EF-3 (Leu167, Ala170, Met191 y Ile194) y EF-4 (Phe218, Met222 y Cys239) establecen interacciones con la hélice C-terminal H10 (Met246, Met249, Phe252, Val255 e Ile256), participando en la estructuración de rDREAM (Figura 2.3.C). De esta manera, las cuatro *manos-EF* quedan dispuestas en una conformación globular con un bolsillo expuesto al disolvente bordeado por residuos hidrófobos tales como Leu96, Phe100, Phe114, Ile117, Tyr118, Phe121, Phe122, Phe151, Leu155, Leu158 y Leu159 (Figura 2.3.D).

Además, los estudios de RMN por difusión y el análisis de relajación del ^{15}N en presencia de calcio han permitido determinar, que en disolución, rDREAM se encuentra en forma de dímero.

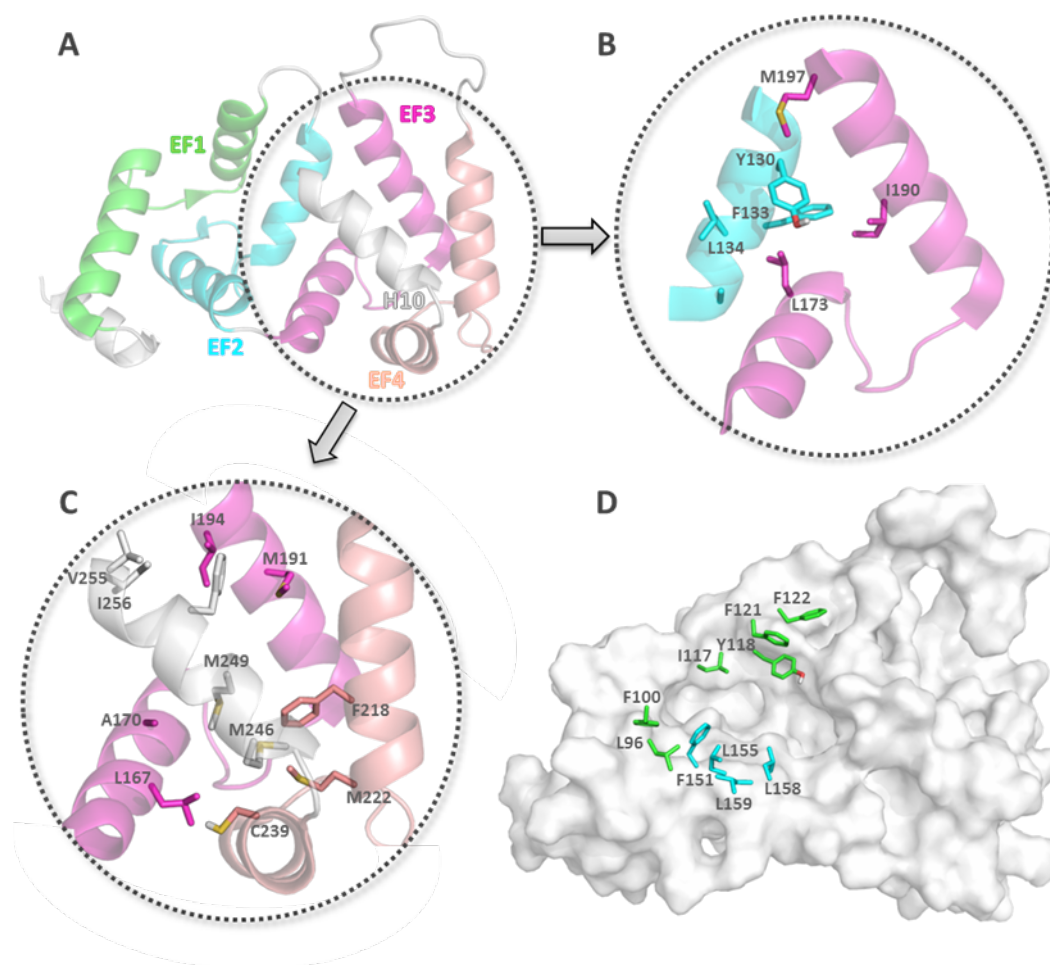


Figura 2.3. Representación esquemática de una estructura de RMN de rDREAM a partir del fichero pdb 2JUL. (A) Se señalan las manos EF en diferentes colores. (B) Residuos que contribuyen a estabilizar la interfaz entre los dos dominios. (C) Residuos implicados en la interacción entre las manos EF-3 y EF-4 con la hélice H10. (D) Bolsillo hidrófobo. Por simplicidad solo se indican los hidrógenos polares¹²

2.1.2. Estructura de rayos X del complejo Kv4.3/KChIP1

Como se ha comentado en la Introducción General, la unión de las subunidades auxiliares KChIPs a los canales Kv4 influye en las propiedades cinéticas del canal.^{9a} La estructura 3D de DREAM unida al canal no se ha resuelto. Sin embargo, se conoce la estructura de rayos X del complejo Kv4.3/KChIP1. Previa a la resolución de las estructuras cristalinas de este complejo, no se conocían los dominios de interacción; sin embargo, diversos estudios indicaban que la formación del complejo requería el extremo citoplasmático N-terminal del canal ^{9a, 13}. Este dominio N-terminal contiene un segmento hidrófobo de aproximadamente 40 residuos y la región de tetramerización T1. La resolución de las estructuras 3D de rayos X del complejo entre KChIP1 y el dominio N-terminal de Kv4.3 (códigos PDB 2I2R y 2NZO)^{9b, 10} permitió definir el modo

de unión, mostrando que una molécula de KChIP1 se une a dos dominios N-terminales de Kv4.3 vecinos formando un complejo de cuatro unidades de KChIP1 con cuatro unidades del canal (4:4). De esta forma se genera un octámero en forma de T, con un tetrámero de Kv4.3 en el centro y las unidades de KChIP1 extendiéndose radialmente. La estructura cristalina permitió identificar dos superficies de interacción entre KChIP1 y el canal, denominadas sitio 1 y sitio 2 (Figura 2.4.A).

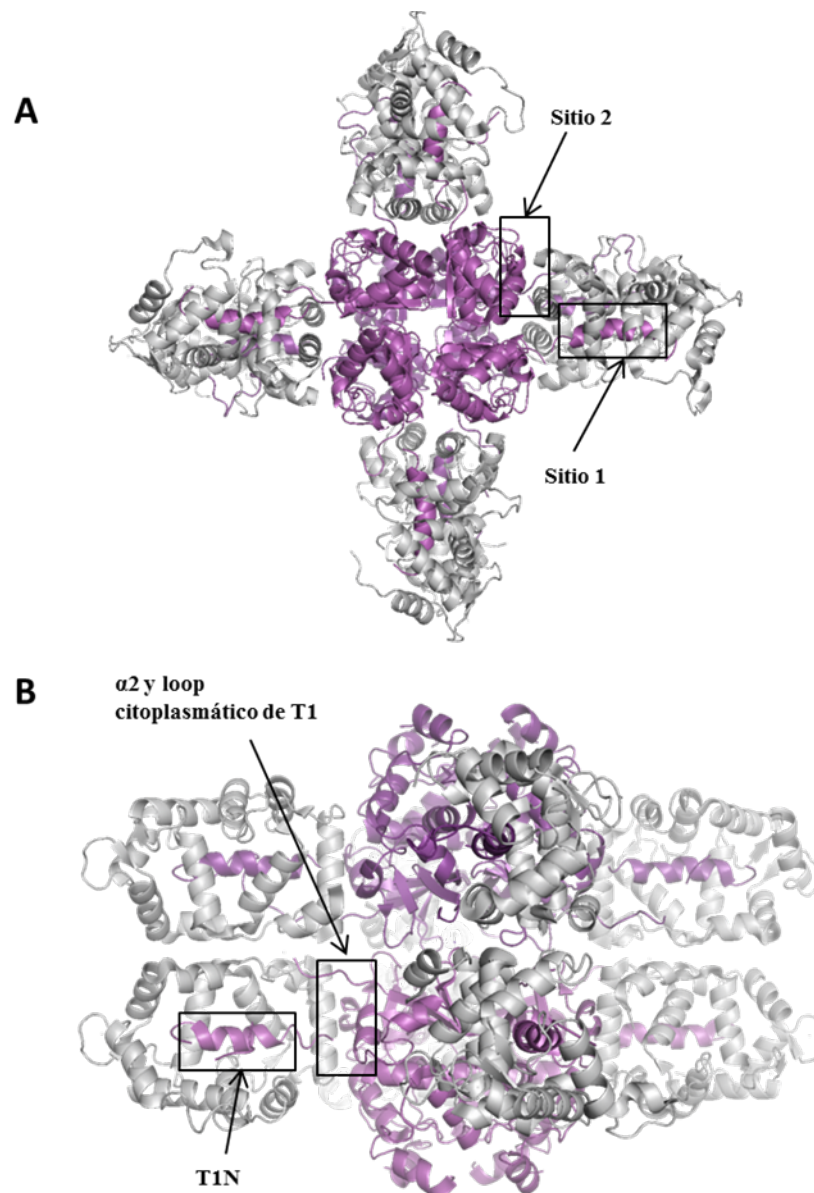


Figura 2.4. Estructura del complejo Kv4.3/KChIP1. A) Vista superior del octámero donde se pueden apreciar 4 regiones N-terminales de Kv4.3 (morado) ensambladas a 4 monómeros de KChIP1 (gris) a través de los sitios de interacción 1 y 2. B) Regiones de unión de T1 con KChIP1 (vista lateral). Figura generada a partir del fichero pdb 2I2R¹²

En el sitio 1 se establecen interacciones de naturaleza hidrófoba entre un segmento del extremo N-terminal de T1 (denominado T1N), residuos 3 a 21 del canal, y un bolsillo hidrófobo amplio de KChIP1. En el sitio 2, la hélice H2 de KChIP1 interacciona con la hélice $\alpha 2$ y un bucle citoplasmático del dominio T1 del canal (Figura 2.4.B).

Un estudio comparativo entre la estructura 3D de KChIP1 humana aislada (código pdb 1S1E)⁷ y la estructura del complejo Kv4.3/KChIP1 (código pdb 2I2R)¹⁰, muestra que algunas regiones de KChIP1 sufren un reordenamiento (Figura 2.5). El cambio conformacional más llamativo se da en la hélice H10, que se desplaza 40° del bolsillo hidrófobo que ocupaba en KChIP1 aislada, y es reemplazada por el péptido N-terminal de Kv4.3 cuando tiene lugar la interacción. Adicionalmente, las hélices H2 y H8 también se desplazan en torno a 2.5 y 1.5 Å, respectivamente, contribuyendo a la formación del bolsillo hidrófobo donde se dispone la hélice del canal T1N.

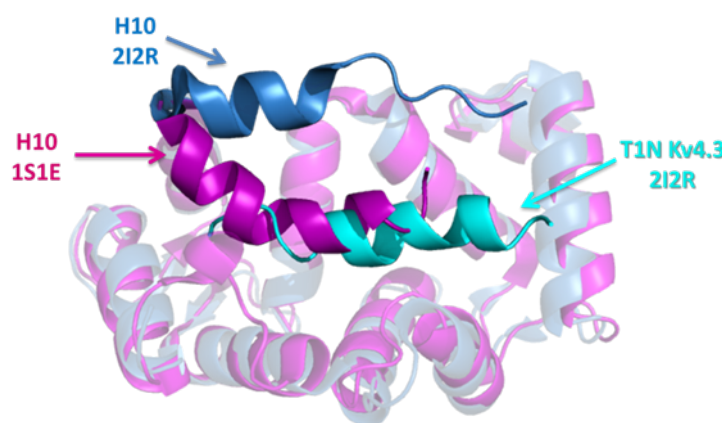


Figura 2.5. Representación esquemática de la superposición de las estructuras de KChIP1 humana (rosa, código pdb 1S1E) y el complejo Kv4.3/KChIP1 (ciano y azul respectivamente; la hélice H10 de este complejo se representa en azul; código pdb 2I2R)¹²

El análisis detallado de las interacciones entre Kv4.3 y KChIP1 ha permitido identificar una serie de interacciones claves en las que participan tres aminoácidos aromáticos del canal, Trp8, Phe11 y Trp19 (Figura 2.6A, B y C). Así, el Trp8 de Kv4.3 interacciona con la Phe60, Val69, Phe74, Ile77 y Phe111 de KChIP1; mientras que, el residuo de Phe11 del canal establece contactos con los aminoácidos de KChIP1 Leu94, Phe98, Phe111, Ala114, Leu115, Leu118 y Trp129. Por último, el Trp19 del canal establece interacciones de Van der Waals con la Tyr134, Ile150, Val151, Ile154, Tyr155 y Phe178 de KChIP1. Por otra parte, es importante señalar la presencia de una serie de

residuos de Ala en Kv4.3, Ala12, Ala14, Ala15 y Ala16, que permiten que la hélice T1N del canal encaje en el bolsillo hidrófobo de KChIP1.

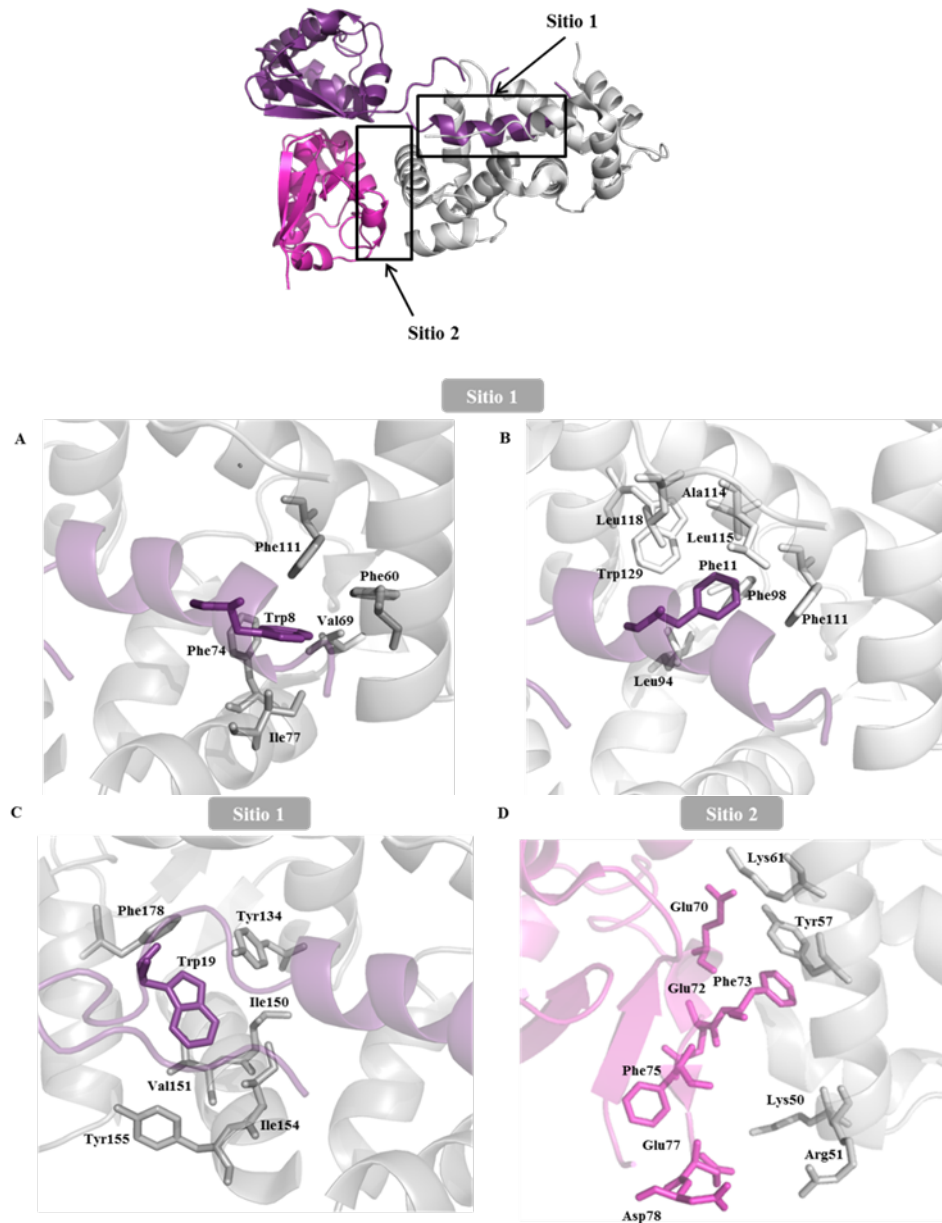


Figura 2.6. Representación de los dominios de unión a KChIP1 (Gris) de Kv4.3 (morado). Se indican los residuos de KChIP1 que participan en la interacción en el sitio 1 con los aminoácidos Trp8 (A), Phe11 (B) y Trp19 (C) del canal. D) Residuos situados en la interfaz entre Kv4.3 (rosa) y KChIP1 (gris) en el sitio 2¹²

A diferencia del sitio 1, la interfaz del sitio 2 presenta un carácter mixto con interacciones hidrófobas e hidrófilas. En este sentido, el residuo de Phe73 del canal es el aminoácido que más contribuye a la hidrofobicidad, a través de una interacción π - π con la Tyr57 de KChIP1; mientras que, el Asp78 de la hélice T1N del canal es capaz de

formar un puente salino con la Arg51 de KChIP1, contribuyendo a la componente hidrófila. Por otro lado, los oxígenos de la cadena principal de Glu72 y Phe75 de Kv4.3, están a una distancia adecuada para formar enlace de hidrógeno con la Gln54 de KChIP1. Finalmente, la interacción del sitio 2 se ve reforzada por la existencia de puentes salinos entre las cadenas laterales del Glu70 y Glu77 del canal y las cadenas laterales de la Lys61 y Lys50 de KChIP1, respectivamente.

2.2. ANTECEDENTES

Como se ha comentado en el Capítulo 1, al inicio de esta tesis, se determinó la interacción de repaglinida (1.1) y CL-888 (1.2) con la proteína DREAM, así como su efecto en la modulación de la interacción Kv4.3/DREAM. En el curso de esta Tesis, se ha estudiado el efecto de repaglinida (1.1) en la modulación de la interacción de DREAM con ATF6. En estos estudios, se ha observado que repaglinida bloquea dicha interacción y aumenta el procesamiento de ATF6, mejorando la función UPR en neuronas del estriado.¹⁴ Sin embargo, en la actualidad, todavía no se ha descrito la estructura tridimensional del complejo ATF6/DREAM. Por otra parte, se estudió el potencial terapéutico de repaglinida (1.1) en un modelo transgénico murino de la enfermedad de Huntington. Para ello, se evaluó el efecto de la administración crónica de repaglinida sobre los trastornos neuromotores en ratones R6/2, mediante un ensayo de coordinación motora. El análisis de los resultados mostró que la coordinación motora empeoraba en los ratones R6/2 no tratados entre las semanas 10 y 17, y que el tratamiento con repaglinida retrasaba el inicio en la pérdida de coordinación de la semana 10 a la semana 17, provocando un incremento significativo de la esperanza de vida (Figura 2.7).¹⁴ Estos prometedores resultados *in vivo* han abierto una nueva vía para la intervención terapéutica en la enfermedad de Huntington.

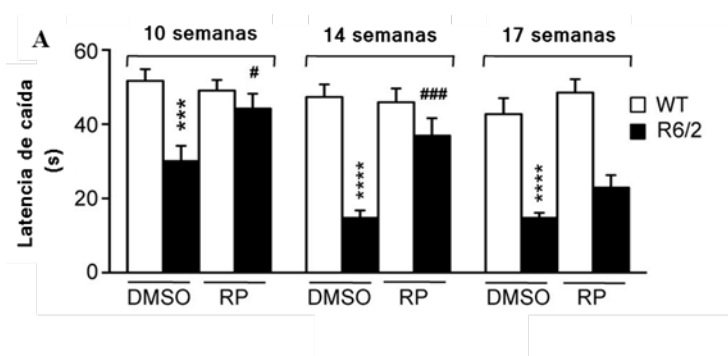


Figura 2.7. Ensayo de coordinación motora en Rota-Rod con ratones salvajes (WT) y R6/2 tratados con repaglinida (RP) o vehículo DMSO desde la quinta semana de vida. Figura adaptada de Naranjo *et al.*¹⁴. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. WT; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. R6/2

2.3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el papel de DREAM en la enfermedad de Huntington, en el presente capítulo se propone como objetivo principal el diseño asistido por ordenador y la síntesis de ligandos de DREAM que sirvan como herramientas farmacológicas para el estudio de las interacciones Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM y su aplicación en la enfermedad de Huntington. Para la consecución de este objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Generar un modelo de DREAM humana por homología a partir de las estructuras de rayos X y RMN de proteínas con secuencias que poseen un alto grado de identidad con hDREAM.
- Diseñar una pequeña quimioteca virtual a partir de los datos previos de los ligandos de DREAM descritos en el Capítulo 1.
- Seleccionar los compuestos con mayor potencial para interaccionar con DREAM en base a estudios de docking molecular.
- Sintetizar los derivados seleccionados y evaluar mediante resonancia de plasmón de superficie su unión a DREAM.
- Validar experimentalmente el sitio de unión mediante estudios de mutagénesis dirigida.
- Estudiar el efecto de los ligandos de DREAM en la modulación de los complejos Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM.
- Evaluar *in vivo* los trastornos motores y cognitivos en un modelo transgénico murino de la enfermedad de Huntington.

En la Figura 2.8 se recogen de manera esquemática los objetivos específicos comentados para lograr el objetivo general de este capítulo.

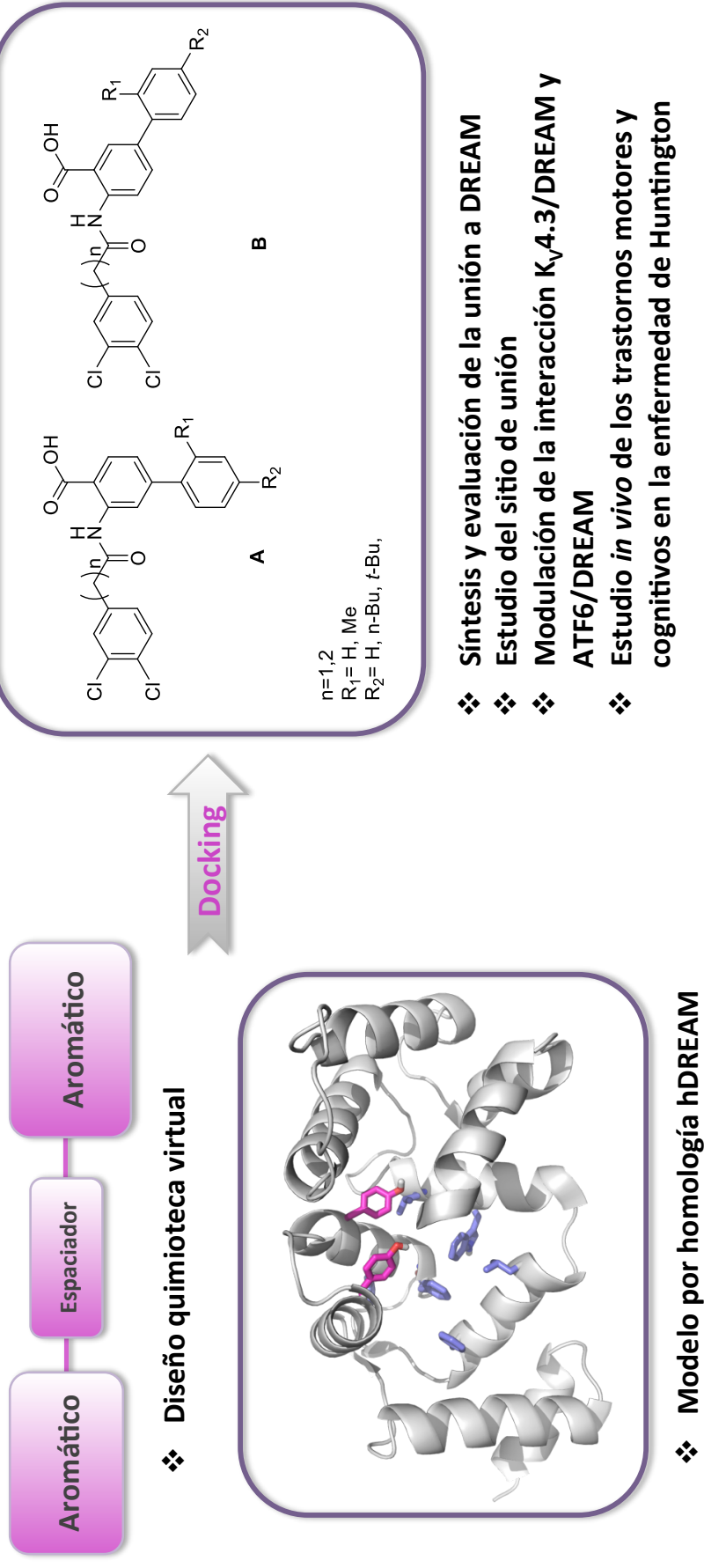


Figura 2.8. Objetivos específicos para la consecución del objetivo general

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este Capítulo, se ha realizado un diseño basado en la estructura de la diana biológica DREAM, utilizando estudios de docking molecular. Estos estudios intentan predecir el mejor modo de interacción entre dos moléculas y para poder realizarlos, es necesario conocer la estructura 3D de dichas moléculas. En el caso de DREAM humana (hDREAM), la estructura 3D no se ha determinado experimentalmente, por lo que previo a los estudios de docking, fue necesario generar un modelo de dicha proteína. En base a este modelo se realizaron los estudios de docking molecular con objeto de identificar nuevos ligandos de DREAM. Los estudios teóricos recogidos en este capítulo han sido dirigidos por la Dra. Mercedes Martín Martínez del Grupo de Peptidomiméticos del Instituto de Química Médica (IQM) del CSIC.

2.4.1. Construcción del modelo de hDREAM, búsqueda y análisis de sitios de unión

La estructura tridimensional de la proteína hDREAM no se ha resuelto experimentalmente, sin embargo, existen proteínas con una secuencia de aminoácidos similar a hDREAM y de estructura tridimensional conocida. A partir de estas proteínas, a las que se denominan plantillas, se puede construir un modelo 3D de la proteína hDREAM. Una de las estrategias para generar dicho modelo es la modelización por homología. La modelización por homología solo necesita la secuencia de la proteína como información de partida, ya que se asume que la estructura tridimensional de las proteínas viene determinada por su secuencia de aminoácidos. Así, proteínas de secuencias similares, adoptan plegamientos análogos. El primer paso, por lo tanto, consiste en la búsqueda y selección de una plantilla adecuada. La calidad del modelo final dependerá de la identidad de secuencia entre hDREAM y la proteína plantilla. Entre las proteínas homólogas a hDREAM, la de mayor identidad de secuencia era la proteína DREAM de ratón cuya estructura 3D se había determinado por RMN (código pdb 1JUL, archivo que contiene 15 estructuras)⁶, y que poseía una identidad de secuencia con hDREAM del 93% y una similitud del

97%. Además, se conocían las estructuras de rayos X de varias KChIPs, en concreto, se seleccionó la estructura de rayos X de KChIP1 humana unida al extremo N-terminal de Kv4.3 (código pdb 2I2R).^{9b} La identidad de secuencia entre hDREAM y KChIP1 era del 69% y la similitud del 87%. Esta última proteína se seleccionó, a pesar de una menor identidad de secuencia, porque al producirse la interacción con el canal se observa un reordenamiento en la estructura 3D de KChIP1 y, por lo tanto, se modifican las cavidades accesibles a los potenciales ligandos. En los estudios de docking es importante tener en cuenta la flexibilidad de la proteína y del ligando. Sin embargo, considerar la flexibilidad de la proteína es muy costoso computacionalmente y la mayoría de los estudios de docking solo tienen en cuenta la flexibilidad conformacional de las cadenas laterales de los aminoácidos del sitio de unión. Por lo tanto, disponer de varios modelos de hDREAM con variaciones en el esqueleto peptídico permitiría considerar cierta flexibilidad global de la proteína y ayudaría a identificar mejor el sitio de interacción.

Una vez identificadas las plantillas, el siguiente paso fue el alineamiento de sus secuencias de aminoácidos con la de la proteína hDREAM. Esta es una etapa clave, ya que un alineamiento incorrecto generaría un modelo inadecuado. En el caso de hDREAM, los altos porcentajes de identidad entre las secuencias de las plantillas seleccionadas facilitaron su alineamiento. A continuación, en base al alineamiento, se construyeron los modelos tridimensionales de la proteína, utilizando el programa de predicción de estructuras de proteínas Prime del paquete de programas Schrödinger. En concreto, se generaron cuatro modelos 3D a partir de cuatro de las estructuras de RMN de rDREAM (código pdb 2JUL) y un modelo a partir de KChIP1 (código pdb 2I2R). Finalmente, la calidad de los modelos obtenidos se evaluó a partir de diagramas de Ramachandran y del servidor Verify3D.

Dada la alta identidad de secuencia entre hDREAM y las proteínas usadas como plantilla, los modelos generados deberían ser adecuados para la búsqueda de ligandos mediante estudios de docking molecular. Estos estudios están optimizados para encontrar el modo de unión entre dos moléculas, pero no para determinar el sitio de unión. Dado que no existe información experimental que evidencie un sitio de interacción, previo a los estudios de docking, es necesario identificar los potenciales sitios de unión de la proteína DREAM. Hay que tener en cuenta que, aunque la estructura tridimensional de una proteína es altamente compleja y densa, cuando ésta se pliega, se generan bolsillos que contienen grupos funcionales no apareados desde el punto de vista energético. A diferencia de las asociaciones entre proteínas que interaccionan a través de grandes superficies, las moléculas de pequeño tamaño

tienden a unirse de forma específica en estas cavidades y modular la función proteica. Para la búsqueda de los sitios de unión se utilizaron los modelos de hDREAM generados y el módulo SiteMap de Schrödinger, el cual permite identificar una o varias regiones cerca de la superficie proteica adecuadas para unir ligandos.¹⁵ Además, este módulo genera mapas de zonas hidrófobas e hidrófilas. De esta forma, se identificaron varios posibles sitios de unión para moléculas pequeñas, que se evaluaron en función del ranking y de la inspección visual. Adicionalmente, dado que uno de los objetivos de esta tesis es la modulación de la interacción Kv4.3/DREAM, se consideraron los residuos implicados en esta interacción. Finalmente, se seleccionó la cavidad en la que se encontraban las tirosinas 118 y 130, que coincide con la región de interacción del extremo N-terminal de Kv4.3 y el C-terminal de DREAM (Sitio1).

Los estudios teóricos indicados proporcionaron cinco modelos de hDREAM y un posible sitio de unión de ligandos. Con objeto de evaluar cuál de los modelos generados era el más adecuado para llevar a cabo la búsqueda de ligandos de DREAM, inicialmente, se analizó si CL-888 (**1.2**) podría interaccionar con el sitio propuesto, por lo que, se realizó un estudio de docking inducido usando el protocolo de Induce Fit Docking de Schrödinger.¹⁶ De forma general, los estudios de docking inducido permiten contemplar parcialmente la flexibilidad de la proteína al posibilitar el movimiento de las cadenas laterales de algunos aminoácidos. En nuestro estudio, se analizaron los residuos en torno a 5 Å del ligando. El análisis de los resultados mostró que el sitio de unión identificado, en cada uno de los modelos generados de hDREAM, permitía la interacción del grupo carboxílico de CL-888 (**1.2**) con las Tyr118 y/o Tyr130 en una región de mapas de contorno favorable a la presencia de aceptores de enlace de hidrógeno. De la misma manera, los anillos aromáticos se localizaron en zonas hidrófobas permitiendo situaciones energéticamente favorables. El estudio sugería que las poses y el ranking eran mejores cuando se utilizaba el modelo obtenido a partir de la estructura de código pdb 2I2R, que se corresponde a la estructura de rayos X de KChIP1 unido a la hélice del extremo N-terminal del canal Kv4.3, en cuya interacción participan las Tyr78 y Tyr90 (equivalentes a la Tyr118 y a la Tyr130 en hDREAM). En base a los resultados obtenidos, se seleccionó este modelo para los estudios posteriores.

2.4.2. Diseño de la quimioteca focalizada y estudios de docking molecular

El diseño de nuevos ligandos de DREAM se realizó a partir del análisis de relaciones estructura-actividad desarrollado en el Capítulo 1, de la inspección visual de la cavidad en el modelo de hDREAM propuesto y de la accesibilidad sintética.

Como se muestra en la Figura 2.9, el análisis de relaciones estructura-actividad de los derivados desarrollados en el Capítulo 1, permitió establecer una serie de elementos esenciales para mantener la afinidad por DREAM ya comentadas. Así, es fundamental la presencia de dos anillos aromáticos, con un espaciador tipo amida con uno o dos grupos metilenos ($n = 1$ ó 2). En el anillo B es clave un grupo ácido en posición orto con respecto al enlace amida. Además, la presencia de átomos hidrófobos más voluminosos que el hidrógeno o el flúor en posición 4 o 5 del anillo B favorece la interacción. Finalmente, se puso de manifiesto la importancia de la sustitución en la posición 3' del anillo A. Por otra parte, el análisis de los complejos hDREAM+CL-888 generados en los estudios de docking molecular, mostró la existencia de un bolsillo hidrófobo no ocupado por el ligando, y que podría explorarse con sustituyentes adecuados en posiciones 4 y 5 del anillo B.

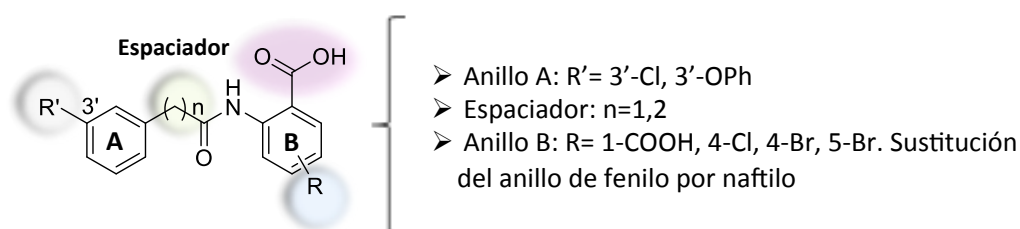
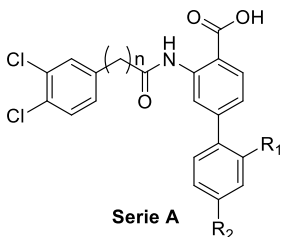
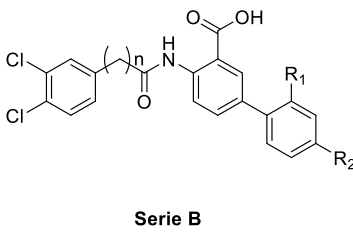


Figura 2.9. Consideraciones generales sobre las relaciones estructura-actividad de los ligandos descritos en el Capítulo 1

En base a estos precedentes, se diseñó una quimioteca virtual de 28 derivados en los que se mantuvo como espaciador un enlace amida con longitud variable ($n=1$ o 2), los átomos de cloro en posición 3' y 4' del anillo A y el grupo carboxilo del anillo B en posición orto con respecto al enlace amida (Tabla 2.1). Adicionalmente, en el anillo B se incorporó un anillo de fenilo en posición 4 (Serie A) o 5 (Serie B), y se exploró el efecto de la presencia de cadenas alifáticas o halógenos sobre dicho anillo como sustituyentes, R_1 y R_2 .

Tabla 2.1. Quimioteca dirigida de potenciales ligandos de hDREAM, diseñada en base a los estudios SAR y docking molecular

|  <p>Serie A</p> |  <p>Serie B</p> | | | | | | |
|---|--|----------------|-----------------|-----------|---|----------------|-----------------|
| Compuesto | n | R ₁ | R ₂ | Compuesto | n | R ₁ | R ₂ |
| 2.1 | 1 | H | H | 2.15 | 1 | H | H |
| 2.2 | 2 | H | H | 2.16 | 2 | H | H |
| 2.3 | 1 | Me | H | 2.17 | 1 | Me | H |
| 2.4 | 2 | Me | H | 2.18 | 2 | Me | H |
| 2.5 | 1 | Cl | Me | 2.19 | 1 | Cl | Me |
| 2.6 | 2 | Cl | Me | 2.20 | 2 | Cl | Me |
| 2.7 | 1 | H | Me | 2.21 | 1 | H | Me |
| 2.8 | 2 | H | Me | 2.22 | 2 | H | Me |
| 2.9 | 1 | H | n-Bu | 2.23 | 1 | H | n-Bu |
| 2.10 | 2 | H | n-Bu | 2.24 | 2 | H | n-Bu |
| 2.11 | 1 | H | <i>t</i> -Bu | 2.25 | 1 | H | <i>t</i> -Bu |
| 2.12 | 2 | H | <i>t</i> -Bu | 2.26 | 2 | H | <i>t</i> -Bu |
| 2.13 | 1 | H | CF ₃ | 2.27 | 1 | H | CF ₃ |
| 2.14 | 2 | H | CF ₃ | 2.28 | 2 | H | CF ₃ |

Con el fin de estudiar la capacidad de los derivados diseñados para interaccionar con hDREAM, se realizó un estudio teórico de docking molecular inducido, utilizando el modelo de hDREAM obtenido en base a la estructura de código pdb 2I2R. Estos estudios generaron para cada compuesto una o varias configuraciones proteína+ligando, a las que se denominan poses, es decir, proporcionaron una localización, orientación y conformación de cada ligando en el sitio de unión. Además, permitieron una caracterización cuantitativa de la interacción, proporcionando una lista ordenada de complejos proteína+ligando en base a las denominadas funciones de score (IFD-score). A modo de ejemplo, en la Figura 2.10 se recogen las poses posibles para los compuestos **2.9** y **2.23**.

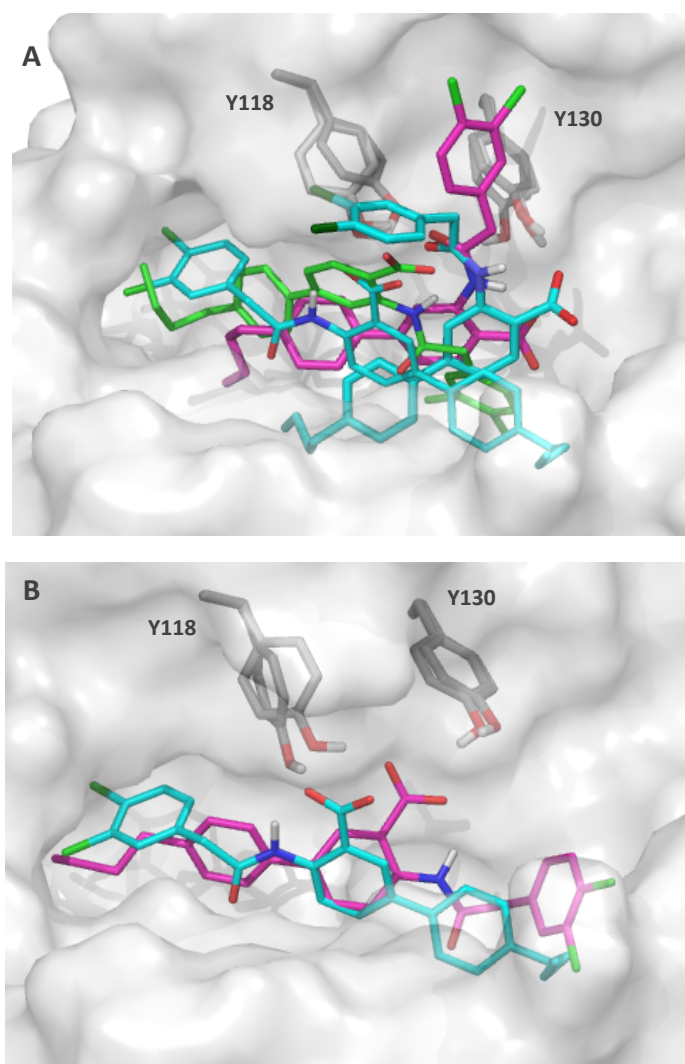


Figura 2.10. Representación de las poses generadas en los estudios de docking molecular para los compuestos **2.9** (A) y **2.23** (B)

La selección de los posibles candidatos a síntesis se realizó en base al ranking proporcionado por los estudios de docking molecular (IFD-score) y a la inspección visual de los complejos hDREAM+ligando. En general, se observó una predilección por sustituyentes voluminosos en R_2 , n -Bu y t -Bu, y sustituyentes en R_1 de menor volumen. Los compuestos **2.1-2.4**, **2.9-2.12**, **2.15-2.18**, **2.23-2.26** mostraron una buena complementariedad con el sitio de unión de hDREAM, por lo que se seleccionaron como candidatos para su síntesis. El análisis de sus complejos mostró que todos presentaban alguna pose con enlace de hidrógeno con la Tyr118 y muchos de ellos, también con la Tyr130 (Tabla 2.2). Esta unión se ve reforzada por las interacciones entre los anillos aromáticos de los compuestos seleccionados y las cadenas laterales de residuos hidrófobos del sitio de unión (Phe114, Phe138, Phe151, Leu134, Leu155, Leu158 y Leu173).

Tabla 2.2. Distancias entre los oxígenos del agrupamiento carboxílico o amida de los derivados **2.1-2.4**, **2.9-2.12**, **2.15-2.18** y **2.23-2.26** y los protones del grupo hidroxilo de las Tyr118 y Tyr130 de hDREAM en los complejos hDREAM-ligando generados en los estudios de docking molecular.^a

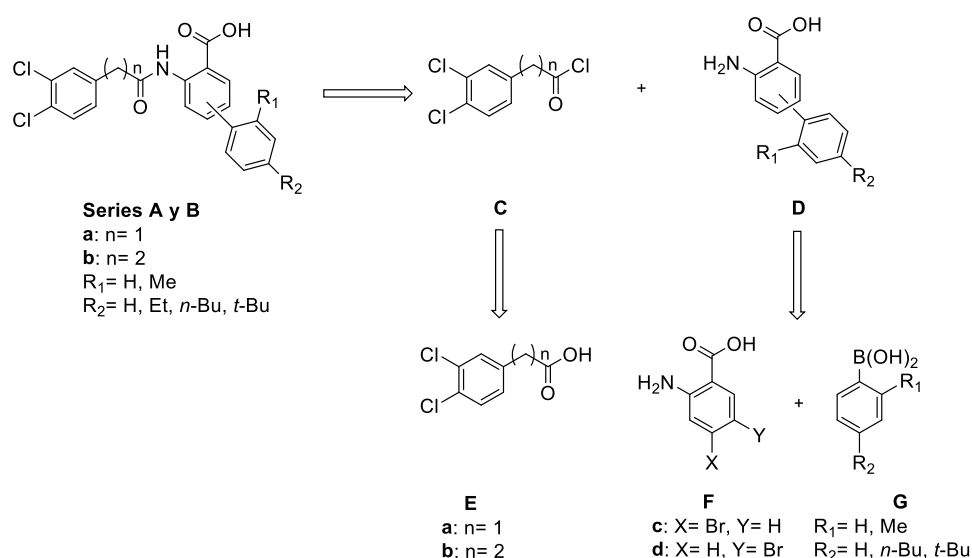
| Serie A | | | | | | Serie B | | | | | |
|---------|------|-------------------|-----|-------------------|-----|---------|------|-------------------|-----|-------------------|-----|
| Ligando | Pose | d (Å) | | d (Å) | | Ligando | Pose | d(Å) | | d (Å) | |
| | | Tyr118(OH) COO | CON | Tyr330(OH) COO | CON | | | Tyr118(OH) COO | CON | Tyr118(OH) COO | CON |
| 2.1 | 1 | 1.8 | - | 1.7 | - | 2.15 | 1 | 1.9 | - | - | - |
| | 2 | 1.6 | - | 1.8 | - | | 2 | - | 1.8 | - | - |
| | 3 | 2.2 | - | - | - | | 3 | - | 2.0 | - | - |
| | 4 | - | - | - | - | 2.16 | 1 | 1.7 | - | 1.7 | - |
| 2.2 | 1 | 1.8 | - | 1.6 | - | | 2 | 1.8 | - | 1.9 | - |
| | 3 | - | - | - | - | | 3 | - | 2.1 | - | - |
| 2.3 | 1 | 3.4 | - | 1.8 | - | 2.17 | 1 | 2.0 | - | 2.2 | - |
| | 2 | - | 1.9 | 2.2 | - | | 2 | 1.6 | - | 1.7 | - |
| | 3 | 1.6 | - | 1.7 | - | | 3 | 1.7 | - | 2.3 | - |
| | 4 | 1.6 | - | - | - | | 4 | 3.3 | - | 2.3 | - |
| 2.4 | 1 | 1.7 | - | 1.6 | - | | 5 | 1.8 | - | 2.9 | - |
| | 2 | 1.7 | - | 2.3 | - | 2.18 | 1 | 2.0 | - | 2.7 | - |
| | 3 | 1.8 | - | 2.1 | - | | 2 | 1.7 | - | 1.8 | - |
| 2.9 | 1 | - | 1.8 | 2.9 | - | | 3 | - | 2.0 | - | - |
| | 2 | - | 1.9 | 1.8 | - | 2.23 | 1 | 1.8 | - | 2.1 | - |
| | 3 | - | - | - | - | | 2 | 1.8 | - | - | - |
| | 4 | - | - | - | - | 2.24 | 1 | 1.8 | - | 1.7 | - |
| 2.10 | 1 | - | 1.8 | 2.4 | - | | 2 | 1.7 | - | 2.2 | - |
| | 2 | 1.9 | - | - | - | 2.25 | 1 | 1.7 | - | 1.8 | - |
| | 3 | - | 2.3 | - | 3.3 | | 2 | - | 3.1 | - | 2.1 |
| | 4 | - | 1.8 | - | - | | 3 | 1.9 | - | - | - |
| 2.11 | 1 | - | 1.7 | - | - | 2.26 | 1 | 1.7 | - | 1.9 | - |
| | 2 | - | 1.8 | - | - | | 2 | 1.6 | - | 1.7 | - |
| | 3 | 2.1 | - | - | - | | 3 | 1.8 | - | - | - |
| | 4 | - | - | - | - | | | | | | |
| | 5 | - | 2.0 | - | - | | | | | | |
| 2.12 | 1 | 1.9 | - | - | - | | | | | | |
| | 2 | - | 1.8 | - | - | | | | | | |
| | 3 | - | 2.0 | - | - | | | | | | |

^a Solo se indican las distancias menores de 3.5 Å. De forma general se considera que si la distancia es menor de 2.5 Å, puede existir un enlace de hidrógeno

2.4.3. Síntesis de los derivados seleccionados de las series A y B

En este apartado se comentan los resultados relativos a la síntesis de los compuestos seleccionados de la serie **A** y **B** (**2.1-2.4**, **2.9-2.12**, **2.15-2.18**, **2.23-2.26**).

Tal como se muestra en el esquema retrosintético 2.1, la síntesis de los compuestos de las series **A** y **B** se planteó a partir de los cloruros de ácido **C** y los bifenílos **D** mediante la formación de un enlace amida. Asimismo, los intermedios **C**, se obtendrían a partir de los correspondientes ácidos **E**. La preparación de los derivados de bifenilo **D** tendría lugar mediante la formación de un enlace C-C a partir de los derivados de bromo-aminoácido **F** y los correspondientes ácidos fenilborónicos **G**.



Esquema 2.1. Estrategia sintética para las amidas de las **series A y B**

La síntesis de los derivados de bifenilo **D** se llevó a cabo por reacción entre el bromoarilo comercial de interés **F** y el correspondiente ácido borónico **G**, a través de la reacción de Suzuki-Miyaura.¹⁷ De forma general, las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por metales de transición representan una estrategia sintética muy útil para la formación de biarilos, estirenos, olefinas alquílicas y alquinos portadores de sustituyentes de distinta naturaleza. Entre los distintos metales de transición, el Pd(0) es uno de los más empleados hoy en día, precisamente, por la gran tolerancia que presenta frente a distintos grupos funcionales. Desde las primeras investigaciones sobre reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por Pd, se han llevado a cabo multitud de estudios para mejorar las variables que garanticen el éxito de este tipo de reacciones. Entre ellas cabe destacar el empleo de catalizadores con ligandos ricos en electrones y voluminosos tales como aquellos que incorporan fosfina ($\text{Pd(PPh}_3)_4$ o $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$) en su estructura.¹⁸ Estos catalizadores se caracterizan por ser estables al aire y por favorecer la etapa oxidante y la eliminación reductora en el ciclo catalítico (Figura 2.11).¹⁸ Otra mejora importante ha sido el empleo de microondas, ya que ha permitido disminuir los largos tiempos de reacción necesarios cuando se utiliza calefacción convencional.¹⁹ Por otro lado, diversos estudios se han dirigido a disminuir costes y a solventar problemas medioambientales a través de acoplamientos cruzados C-C en medio acuoso. Existen varias metodologías para llevar a cabo acoplamientos Suzuki en medios acuosos, bien con catalizadores de Pd(0) solubles en agua,²⁰ usando condiciones de transferencia de fase²¹ o con mezclas de disolventes.²²

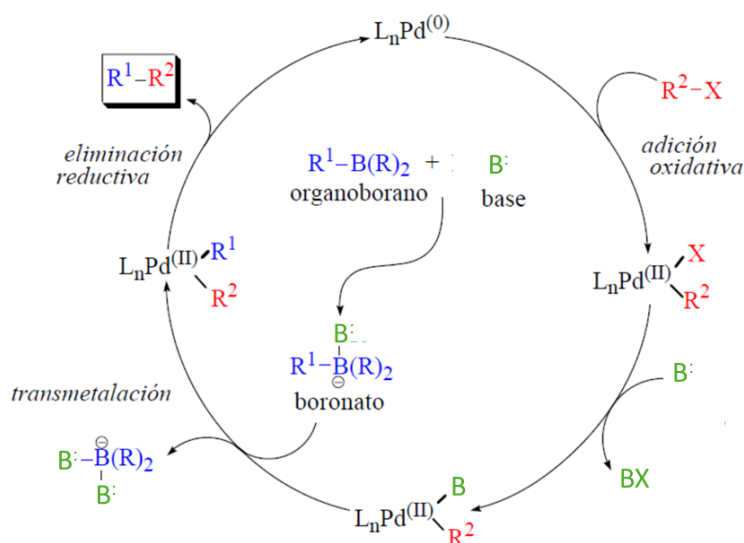
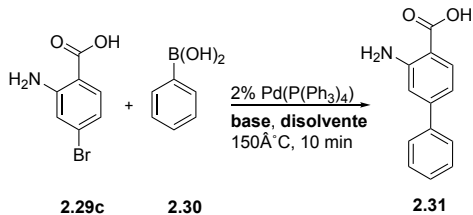


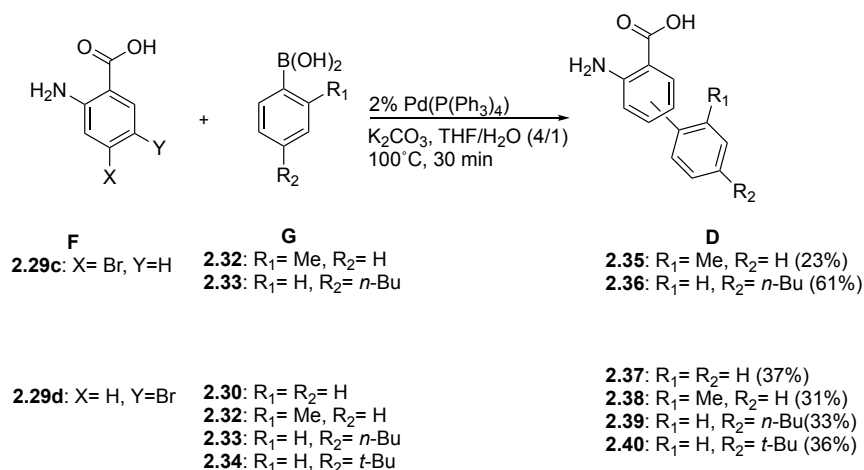
Figura 2.11. Ciclo catalítico para la reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura

Tomando como punto de partida estos precedentes, la formación de los derivados de bifenilo **D** se llevó a cabo en presencia de un 4% de $Pd(PPh_3)_4$ como catalizador, a $150^\circ C$ durante 10 min en microondas y en una mezcla de tolueno/MeOH/ H_2O (2/1/1) como disolvente. Inicialmente, utilizando estas condiciones, se hizo reaccionar el ácido 2-amino-4-bromobenzoico (**2.29c**) y el ácido bencenoborónico (**2.30**) para obtener el correspondiente bifenilo **2.31** (Entrada 1, Tabla 2.3). En estas condiciones, como se observó por el seguimiento de la reacción por HPLC-MS, la reacción de acoplamiento condujo al producto deseado con baja conversión (5%). Con el fin de incrementar el porcentaje de conversión, se llevó a cabo un proceso de optimización de las condiciones de reacción, donde se consideró primeramente la influencia del disolvente. El empleo de THF/ H_2O (4/1) como mezcla de disolventes (Entrada 2, Tabla 2.3) mostró una pequeña mejora en la conversión (9%) con respecto al uso de tolueno/MeOH/ H_2O . A continuación, se analizó el efecto de la bases inorgánicas más ampliamente empleadas en bibliografía, Na_2CO_3 , K_2CO_3 y KOH (Entradas 2, 3 y 4 respectivamente, Tabla 2.3). Aunque no se observaron diferencias significativas, el seguimiento de la reacción por HPLC, mostró que la mayor conversión se alcanzaba con la mezcla de disolventes THF/ H_2O (4/1) y con KOH o K_2CO_3 como base (Entrada 3 y 4, Tabla 2.3). Sin embargo, el empleo de la base K_2CO_3 dio lugar a un crudo mucho más limpio debido a la formación de un menor número de subproductos en la reacción de acoplamiento.

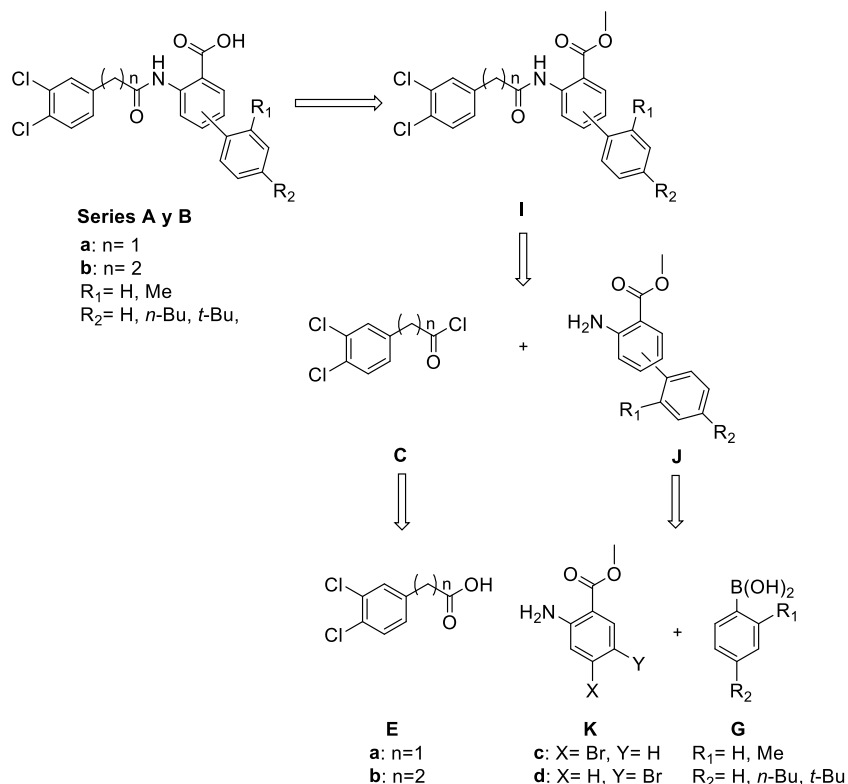
Tabla 2.3. Estudio de optimización de condiciones de reacción

|  | | | |
|---|-------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Entrada | Disolvente | Base | Conversión (%) |
| 1 | Tolueno/MeOH/H ₂ O | Na ₂ CO ₃ | 5 |
| 2 | THF/H ₂ O (4/1) | Na ₂ CO ₃ | 9 |
| 3 | THF/H ₂ O (4/1) | K ₂ CO ₃ | 17 |
| 4 | THF/H ₂ O (4/1) | KOH | 20 |

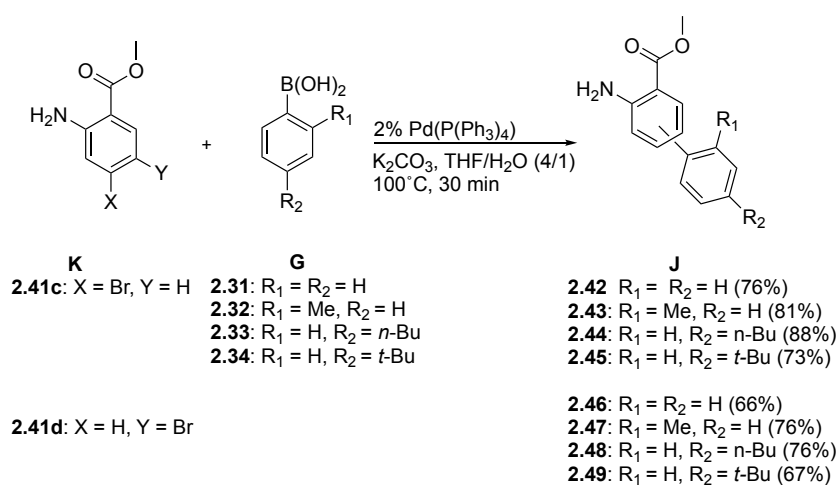
Independientemente de la base o mezcla de disolventes empleados, en todos los casos los bajos rendimientos obtenidos eran debidos a la formación, como producto mayoritario, del bifenilo correspondiente al homoacoplamiento del bromoarilo. Distintos estudios sobre las condiciones de reacción de arilación catalítica indican que la formación de dicho subproducto está favorecida por el empleo de altas temperaturas y cargas elevadas de catalizador.²³ Por lo tanto, y con el fin de incrementar los rendimientos de obtención de los productos deseados, se decidió reducir el porcentaje de catalizador y la temperatura. Así, se estudió la preparación del intermedio **2.31** a distintos tiempos de reacción y en presencia de un 2% del catalizador Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃ como base, en una mezcla de THF/H₂O (4/1) a 100°C en microondas. El análisis del crudo de reacción mediante HPLC a 10, 20 y 30 min, permitió observar una conversión completa a los 30 minutos de reacción. La purificación por cromatografía de media presión en fase reversa con acetonitrilo/H₂O, permitió aislar el producto deseado con un 34% de rendimiento. Siguiendo esta metodología se sintetizaron los derivados de bifenilo **D** (Esquema 2.2). Aunque en todos los casos se alcanzó una elevada conversión en la formación de los productos de condensación **D**, la presencia del grupo carboxilo dificultó la purificación de los mismos, dando lugar a los productos deseados con rendimientos de moderados (**2.36**) a bajos (**2.35**, **2.37-2.40**).

Esquema 2.2. Síntesis de los intermedios de biphenilo **D**

Con el fin de mejorar los bajos rendimientos de reacción, se decidió proteger el grupo ácido en forma de éster metílico lo que facilitaría el proceso de aislamiento de los productos deseados. El esquema retrosintético planteado en este caso fue muy similar al anterior, presentando una etapa adicional de desprotección del éster metílico (Esquema 2.3).

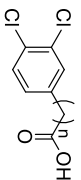
Esquema 2.3. Retrosíntesis de los derivados de interés **A** y **B**, utilizando como intermedio de los ésteres metílicos **I**

La síntesis de los derivados de bifenilo portadores de un grupo éster metílico **J** (**2.42-2.49**), se llevó a cabo siguiendo la metodología comentada anteriormente (Esquema 2.4). Para ello, se hizo reaccionar el correspondiente ácido bencenoborónico **G** (**2.31-2.34**) con los respectivos ésteres **K** (**2.41c** y **2.41d**) en presencia de un 2% del catalizador $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 como base y una mezcla de THF/ H_2O (4/1) como disolvente, a 100°C en microondas durante 30 minutos. En este caso, la purificación del crudo de reacción por cromatografía de media presión, utilizando una mezcla de hexano/ AcOEt como eluyente, resultó relativamente sencilla, lo que permitió obtener los productos deseados con buenos rendimientos, 66-88% (Esquema 2.4)

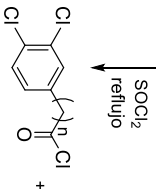


Esquema 2.4. Síntesis de los bifenilos portadores de un grupo éster

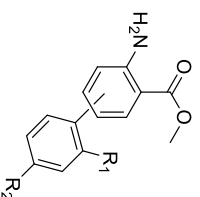
La condensación de los derivados de bifenilo **J** (**2.42-2.49**) con el correspondiente cloruro de ácido **C** se llevó a cabo utilizando el procedimiento optimizado en el Capítulo 1 para la formación de enlaces amida (Esquema 2.5). Los cloruros de ácido **C**, no comerciales, se obtuvieron por reacción con cloruro de tionilo, a partir de los ácidos **2.50a**, cuando n es igual a 1, y **2.50b**, cuando n es igual a 2. Los cloruros de ácido obtenidos se hicieron reaccionar *in situ* con los correspondientes bifenilos **J** (**2.42-2.49**) en presencia de óxido de propileno, como captador del ácido clorhídrico generado, y THF anhidro como disolvente, lo que dio lugar a la obtención con buenos rendimientos de los productos deseados portadores del éster metílico **I** (**2.51-2.66**) (Esquema 2.5). Finalmente, la hidrólisis básica de estos ésteres, con una disolución de NaOH 1N en THF/ MeOH (2/1), permitió obtener los productos finales deseados de las series **A** y **B** (**2.1-2.4**, **2.9-2.12**, **2.15-2.18** y **2.23-2.26**) con excelentes rendimientos, sin necesidad de purificación adicional.



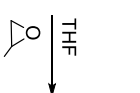
E
2.50a: n=1
2.50b: n=2



C
a: n=1
b: n=2



J



I



Serie A

- 2.42: R₁=R₂=H (76%)
2.43: R₁=Me, R₂=H (81%)
2.44: R₁=H, R₂=*n*-Bu (88%)
2.45: R₁=H, R₂=*t*-Bu (73%)
- 2.51: R₁=R₂=H, n=1 (71%)
2.52: R₁=R₂=H, n=2 (70%)
2.53: R₁=Me, R₂=H, n=1 (47%)
2.54: R₁=Me, R₂=H, n=2 (67%)
2.55: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=1 (72%)
2.56: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=2 (78%)
2.57: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=1 (69%)
2.58: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=2 (72%)
- 2.1: R₁=R₂=H, n=1 (91%)
2.2: R₁=R₂=H, n=2 (89%)
2.3: R₁=Me, R₂=H, n=1 (92%)
2.4: R₁=Me, R₂=H, n=2 (92%)
2.9: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=1 (94%)
2.10: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=2 (89%)
2.11: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=1 (87%)
2.12: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=2 (93%)

Serie B

- 2.46: R₁=R₂=H (66%)
2.47: R₁=Me, R₂=H (76%)
2.48: R₁=H, R₂=*n*-Bu (76%)
2.49: R₁=H, R₂=*t*-Bu (67%)
- 2.59: R₁=R₂=H, n=1 (80%)
2.60: R₁=R₂=H, n=2 (62%)
2.61: R₁=Me, R₂=H, n=1 (84%)
2.62: R₁=Me, R₂=H, n=2 (99%)
2.63: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=1 (67%)
2.64: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=2 (81%)
2.65: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=1 (63%)
2.66: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=2 (60%)
- 2.15: R₁=R₂=H, n=1 (98%)
2.16: R₁=R₂=H, n=2 (99%)
2.17: R₁=Me, R₂=H, n=1 (91%)
2.18: R₁=Me, R₂=H, n=2 (66%)
2.23: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=1 (92%)
2.24: R₁=H, R₂=*n*-Bu, n=2 (91%)
2.25: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=1 (96%)
2.26: R₁=H, R₂=*t*-Bu, n=2 (91%)

Esquema 2.5. Síntesis de los compuestos objetivo de las series A y B

2.4.4. Evaluación de las interacciones DREAM/ligando

La evaluación de la interacción entre los compuestos sintetizados y la proteína DREAM se llevó a cabo utilizando la técnica de resonancia de plasmón de superficie (SPR), siguiendo la metodología comentada en el Capítulo 1 y en el anexo 2. El nivel de inmovilización de GST-DREAM en la superficie del chip fue de 8815 RU y todos los compuestos se analizaron a una concentración de 5 μ M. Al igual que en el Capítulo 1, en todos los experimentos, se eligieron como control de referencia CL-888 (**1.2**), que se utilizó como control positivo de interacción y del estado del chip, y glibencamida (Gb, **1.4**), que se empleó como control negativo. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 2.12. Para facilitar el análisis comparativo de los resultados, se representa el nivel de respuesta obtenido para la interacción de cada uno de los compuestos con DREAM a los 40 s del inicio del experimento.

A la vista de los resultados recogidos en la Figura 2.12, se puede concluir que los derivados diseñados en este capítulo presentan mayor afinidad por DREAM que el prototipo CL-888 (**1.2**) y el cabeza de serie **1.6** del Capítulo 1. Con respecto a la influencia de la longitud del espaciador, los derivados de la **serie A** que presentan un espaciador con $n=2$ (**2.2**, **2.10**, y **2.12**) mostraron mayor capacidad para interaccionar con DREAM que aquellos cuyo espaciador era $n=1$ (**2.1**, **2.9**, y **2.11**); a excepción de los compuestos **2.3** y **2.4**, portadores de un grupo Me en R_2 , que mostraron respuestas similares. En la **serie B**, la longitud del espaciador no tuvo influencia en la afinidad por DREAM. En cuanto a la influencia del sustituyente en R_1 , se observa que, de manera general, la sustitución de H (**2.1**, **2.15** y **2.16**) por Me (**2.3**, **2.17** y **2.18**) dio lugar a respuestas similares. Como excepción, cabe destacar la menor capacidad de interacción por DREAM que presentó el derivado portador de un resto Me **2.4**. Por otra parte, se observa que la sustitución R_2 tiene una gran influencia en la actividad. De manera general, un aumento de volumen estérico en el sustituyente R_2 va acompañado de un incremento en la actividad. Así, los derivados portadores de un grupo *n*-butilo (**2.9**, **2.10**, **2.24**, **2.25**) o *terc*-butilo (**2.12**, **2.26**) fueron los que mostraron los mejores resultados, aumentándose considerablemente la unión a DREAM, en comparación con el prototipo CL-888 (**1.2**) y con **1.6**. Estos resultados están de acuerdo con los estudios teóricos que indicaban la existencia de un bolsillo hidrófobo que podría ocuparse con sustituyentes voluminosos.

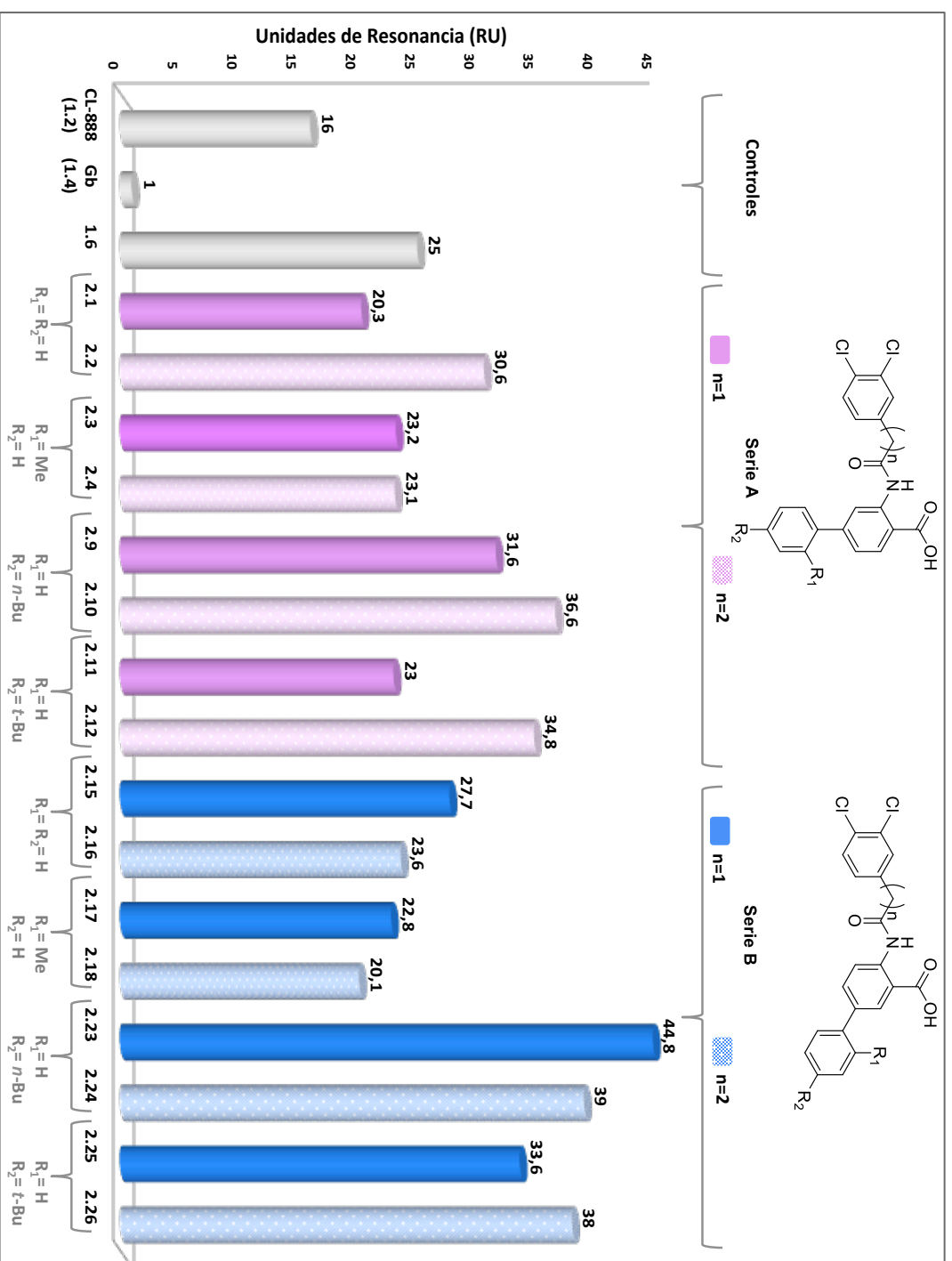


Figura 2.12. Representación de las señales de SPR producidas por la interacción de los compuestos objetivo de las series A y B frente a GST-DREAM a los 40 s de la inyección. Los controles CL-888 (1.2), glibencamida (Gb, 1.4) y 1.6 son mostrados en gris. En rosa y azul sólido se muestran los compuestos de las series A y B respectivamente para n=1. En rosa y azul punteado se muestran los compuestos de las series A y B respectivamente para n=2

Es importante señalar que los mejores resultados en ambas series, con independencia de la longitud del espaciador, se obtienen cuando R_2 es un grupo *n*-butilo. Por el contrario, cuando R_2 es un resto *terc*-butilo, la longitud del espaciador es crítica, siendo el espaciador con dos grupos metilenos ($n=2$) el que da lugar a los mejores resultados. La menor afinidad de los derivados con un grupo *terc*-butilo y un espaciador con un único grupo metileno ($n = 1$, **2.11** y **2.25**), en comparación con los correspondientes a un espaciador con dos grupos metilenos ($n = 2$, **2.9** y **2.23**), no se pudo anticipar en base a los estudios teóricos. Un análisis de los complejos de estos derivados con hDREAM muestra que tanto el resto *n*-butilo, como *terc*-butilo ocupan el mismo bolsillo, una zona hidrófoba de empaquetamiento compacto, en la que pueden participar los residuos Val109, Phe100, Phe114, Leu117 y Phe151 de hDREAM. El mayor impedimento estérico del grupo *terc*-butilo pudiera ser la causa de la menor afinidad de los derivados **2.11** y **2.25** por DREAM. Por tanto, que el aumento de un eslabón en el espaciador de lugar a un incremento de la afinidad en los derivados de un resto $R_2 = \textit{terc}$ -butilo, se podría atribuir a que este grupo se pudiera situar mejor dentro del bolsillo hidrófobo mencionado.

Finalmente, se midió la afinidad por GST-DREAM de los intermedios portadores de un éster metílico (**2.51-2.66**) en lugar de un resto carboxilo, observándose en todos los casos una pérdida en la capacidad de interacción. Estos resultados corroboran los resultados obtenidos en el Capítulo 1 donde se estableció la importancia del ácido carboxílico para la interacción con DREAM.

Adicionalmente, se estudió la influencia de la longitud de la cadena alquílica en R_2 . Para ello se llevó a cabo la síntesis y evaluación biológica, por SPR, del derivado **2.67** portador de un resto etilo en el anillo de fenilo situado en posición 4 (serie A) y un espaciador con un grupo metileno (serie A, $R_1=H$, $R_2=Et$, $n=1$). La síntesis del compuesto **2.67** se llevó a cabo siguiendo la metodología optimizada para los análogos de las series A y B (Apartado 2.4.3). Cuando se comparó la respuesta obtenida por SPR de los derivados **2.9** y **2.67**, portadores de un resto *n*-Bu y Et respectivamente, se observó una disminución del 50% de la capacidad de unión a DREAM en **2.67**, indicando que el acortamiento de esta cadena alquílica va en detrimento de la actividad.

2.4.5. Definición del sitio de unión

Los estudios de docking molecular muestran que, aunque la disposición espacial de los derivados de las **series A** y **B** es diferente, todos ellos interaccionan en el mismo sitio de unión de la proteína hDREAM, compartiendo residuos esenciales para la interacción (Figura 2.13). Como se ha comentado anteriormente, este sitio solapa parcialmente con el correspondiente sitio de unión de Kv4.3 a KChIP1. En la Figura 2.16 se encuentran recogidas poses representativas de los compuestos de la **serie A**, **2.9** y **2.10**, y de la **serie B**, **2.23** y **2.24**. En estas poses, los derivados de la **serie A** forman enlaces de hidrógeno con la Tyr118 a través del oxígeno del enlace amida, y con la Tyr130 por el oxígeno carboxílico. Por otra parte, en la **serie B** se establecen dichos enlaces solo a través del oxígeno carboxílico de los ligandos. Los derivados **2.9**, **2.10**, **2.23** y **2.24** están alojados en una cavidad hidrófoba de DREAM y presentan una serie de residuos comunes, como las fenilalaninas Phe114, Phe138 y Phe151, o las leucinas Leu134, Leu155, Leu158 y Leu173.

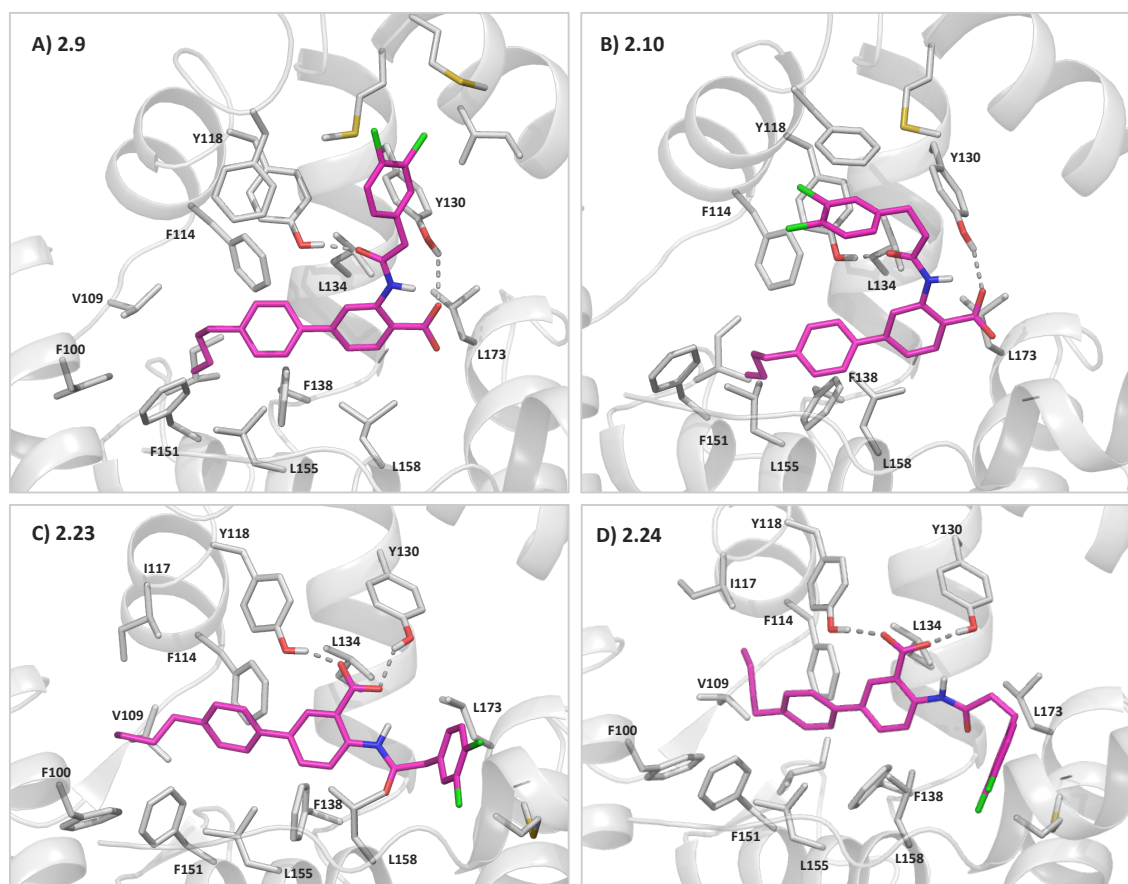


Figura 2.13. Representación esquemática de los complejos entre hDREAM y los compuestos A) **2.9**, B) **2.10**, C) **2.23** y D) **2.24**. Solo se muestran los hidrógenos polares. Los enlaces de hidrógeno se representan como líneas punteadas

Con objeto de verificar experimentalmente el sitio de unión identificado por los estudios teóricos, se llevó a cabo un estudio de mutagénesis dirigida. En concreto, se seleccionaron las tirosinas 118 y 130 ya que, de acuerdo a los estudios de docking molecular, éstas podrían participar en la formación de enlaces de hidrógeno con los ligandos. Por lo tanto, se prepararon dos mutantes, (Tyr118Ala)-hDREAM y (Tyr130Ala)-hDREAM, mediante técnicas de mutagénesis dirigida, utilizando el método Quick Change (Stratagene).

El estudio del efecto de las mutaciones de DREAM en la interacción de los compuestos sintetizados por dicha proteína, se realizó mediante SPR. Con objeto de estudiar si el sitio de unión de estos derivados era el mismo que el de los compuestos del Capítulo 1, se evaluó también el derivado más potente **1.83**. Como en todos los casos, glibencamida (Gb, **1.4**) se empleó como control negativo del ensayo. En la Figura 2.14, se recogen los valores en unidades de resonancia (RU) para los derivados de las **series A y B** respectivamente, frente a los mutantes (Tyr118Ala)-hDREAM y (Tyr130Ala)-hDREAM, a los 40 s del experimento y a una concentración de 10 μ M. A modo comparativo, se incluyen los resultados de afinidad de estas series frente a hDREAM nativo (DR).

A la vista de los resultados mostrados en la Figura 2.14, se puede concluir que en todos los casos se observa una disminución de la unión de los ligandos ensayados a los mutantes (Tyr118Ala)-hDREAM y (Tyr130Ala)-hDREAM, si se compara con las respuestas obtenidas para DREAM (DR). Además, la afinidad del derivado **1.83** no se vio afectada por estas mutaciones indicando, que, a pesar de compartir el mismo esqueleto central basado en dos anillos aromáticos separados por un espaciador tipo amida y con un grupo carboxilo en posición orto con respecto al espaciador, los derivados del presente capítulo no ocupan el mismo sitio de interacción que el compuesto **1.83**.

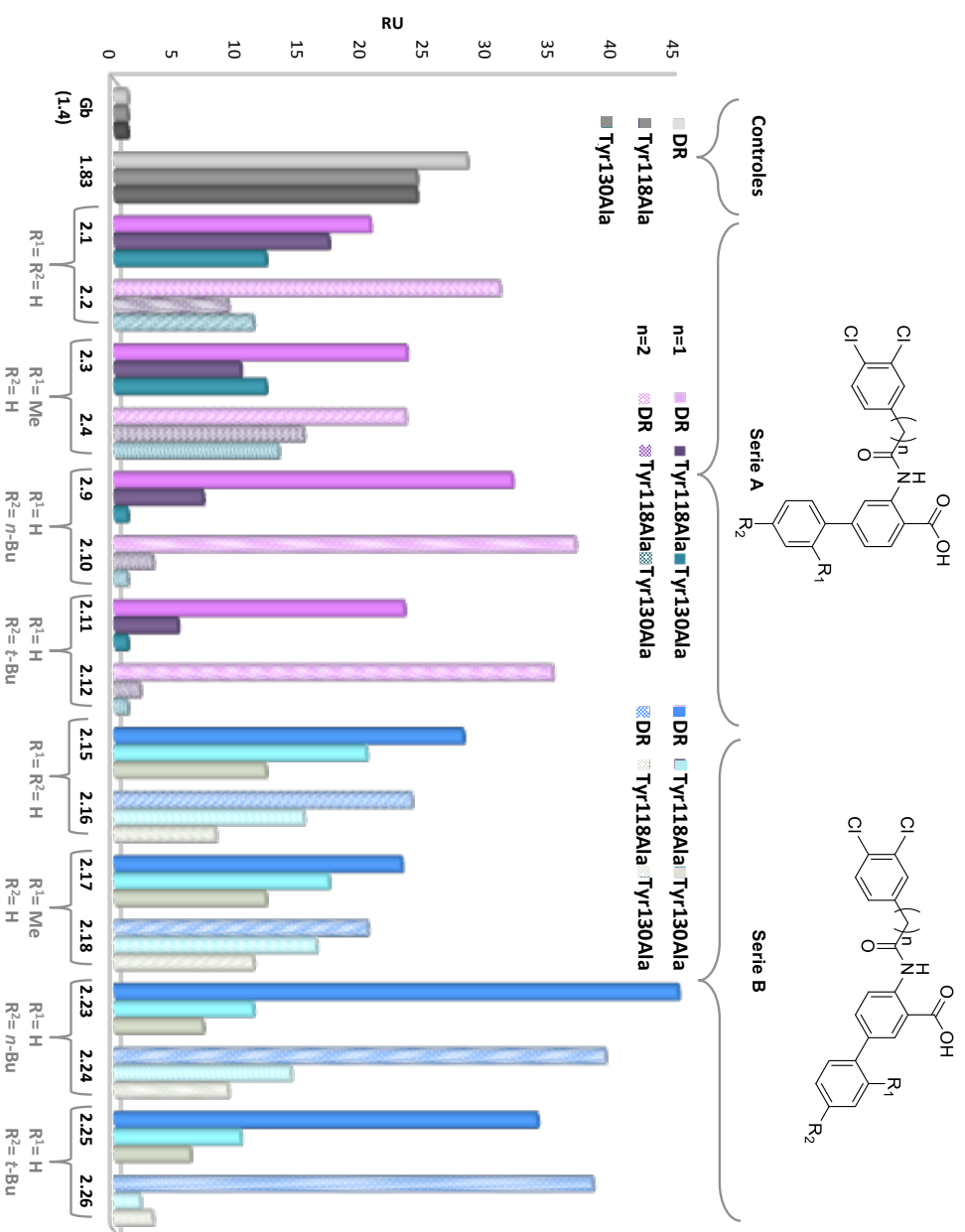


Figura 2.14. Estudio del efecto de las mutaciones de DREAM en la unión de los ligandos de las series A y B

2.4.6. Modulación de las PPIs de DREAM

2.4.6.1. Modulación de la interacción $K_v4.3$ /DREAM

Con el objetivo de estudiar el efecto funcional de los ligandos de DREAM identificados en el presente capítulo sobre la corriente generada por los canales $K_v4.3$, ensamblados o no con DREAM, las características electrofisiológicas de las corrientes generadas por $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM se analizaron mediante la técnica “*patch-clamp*”. Para estos estudios se seleccionaron el derivado **2.9** de la **serie A** y **2.23** de la **serie B**. Estos estudios se realizaron bajo la dirección de la Dra. Carmen Valenzuela en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBM, CSIC-UAM).

2.4.6.1.1. Estudios de electrofisiología del derivado **2.23**

La Figura 2.15 muestra la curva concentración-efecto bloqueante del ligando **2.23** sobre los canales $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM. Este compuesto bloquea los canales $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM de forma concentración-dependiente, observándose que la inhibición de la corriente generada tras la activación de los canales $K_v4.3$ es ligeramente menor en presencia de DREAM.

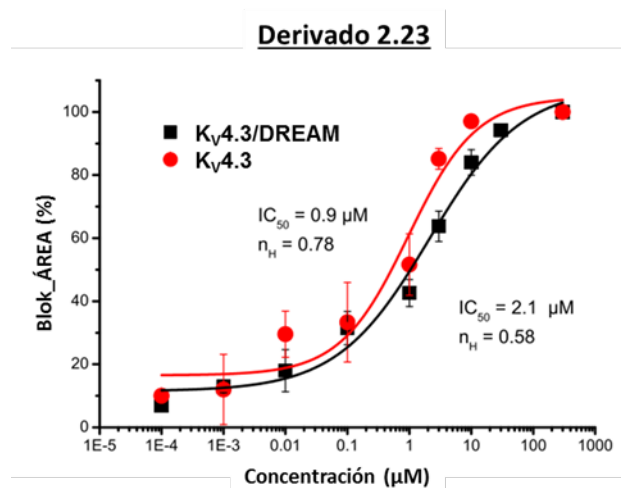


Figura 2.15. Curva dosis respuesta del compuesto **2.23** en los canales $K_v4.3$ (línea negra) y $K_v4.3$ /DREAM (línea roja)

El ajuste de los valores obtenidos a la ecuación de Hill = $1 / [1 + (CI_{50} / [F])^{nH}]$, dio lugar a una CI_{50} de 0.9 μM para $K_v4.3$ y de 2.1 μM para $K_v4.3$ /DREAM. Por tanto, se puede concluir que el derivado **2.23** no presenta selectividad por DREAM; es decir,

se une con la misma afinidad al canal $K_v4.3$ que al complejo $K_v4.3$ /DREAM. Debido a la falta de especificidad de unión mostrada por **2.23**, no se realizó el cálculo de las constantes cinéticas.

2.4.6.1.2. Efectos electrofisiológicos del derivado **2.9** sobre los canales $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM

En la Figura 2.16 se muestran los registros de las corrientes generadas tras la activación de canales $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM, en ausencia y en presencia del derivado **2.9** (100 nM). Como se puede observar, a esta concentración, **2.9** no modifica la magnitud de la corriente $K_v4.3$, mientras que si disminuye la de $K_v4.3$ /DREAM.

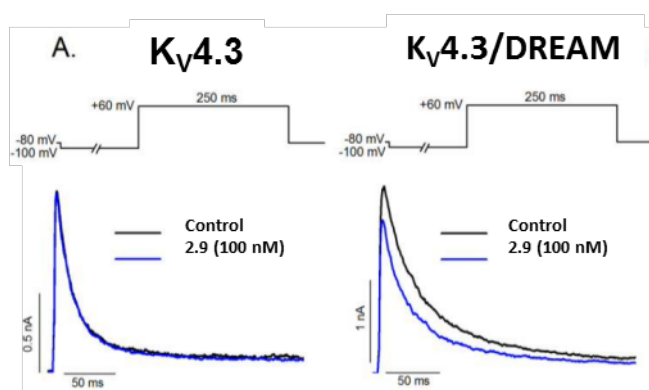


Figura 2.16. Efecto de **2.9** a 100 nM (n=11) sobre los canales $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM

Con el fin de analizar la dependencia con la concentración de los efectos producidos por el compuesto **2.9**, se estudiaron los efectos inhibidores del mismo en un rango de concentraciones comprendidas entre 0.01 y 10 μ M en ambos canales. La Figura 2.17 muestra el grado de bloqueo producido por el ligando **2.9** sobre los canales $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM. Como se muestra en la gráfica, **2.9** inhibe la corriente generada por los canales $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM de forma concentración-dependiente, produciendo una mayor inhibición en presencia de DREAM. Además, a bajas concentraciones (0.01-1 μ M), **2.9** produce una mayor inhibición de la corriente cuando DREAM está presente (4.6 ± 0.9 vs. 11.8 ± 1.6 % en $K_v4.3$ y $K_v4.3$ /DREAM, respectivamente, n=11, $p < 0.01$). Al igual que en el Capítulo 1, los valores de la inhibición de la corriente fueron ajustados a la ecuación de Hill = $1 / [1 + (CI_{50} / [F])^{n_H}]$, a partir de la cual se obtuvo una CI_{50} para **2.9** de 9.7 μ M y un $n_H=0.73$ para n=45. Cuando el coeficiente de Hill se ajustó a la unidad, se obtuvo un valor de $CI_{50}= 8.8 \mu$ M. Este valor es muy similar al obtenido experimentalmente, lo que indica que la unión

del derivado **2.9** al canal $K_v4.3$ /DREAM no presenta cooperatividad. No se pudieron estudiar los efectos de este derivado a mayores concentraciones, ya que a concentraciones superiores a $10\mu\text{M}$, el compuesto precipita.

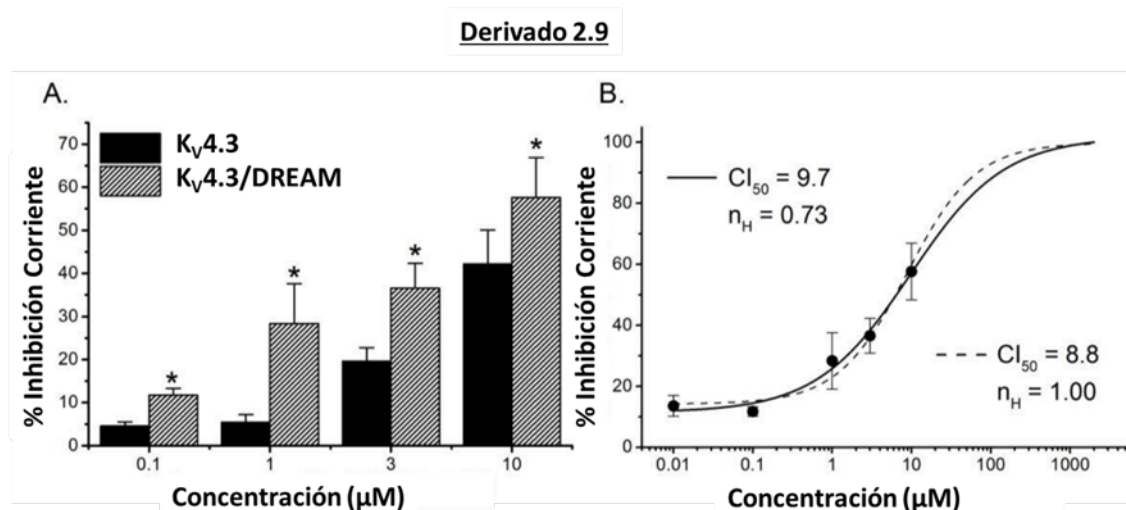


Figura 2.17. A: Influencia de la concentración sobre el efecto bloqueante producido por **2.9** en los canales $K_v4.3$ y $K_v4.3/\text{DREAM}$ medido a la amplitud máxima de la corriente. B: Curva dosis respuesta del compuesto **2.9** (línea continua) en los canales $K_v4.3/\text{DREAM}$. La línea discontinua se corresponde a un ajuste con un n_H fijado a 1. Los datos representan la media \pm E.E.M de los experimentos a cada concentración ($n = 45$)

En la Tabla 2.4, se recogen los efectos producidos por **2.9** ($3\mu\text{M}$) sobre la cinética de activación, de inactivación y de recuperación de la inactivación tanto en el canal $K_v4.3$, como en el complejo $K_v4.3/\text{DREAM}$. Como se ha comentado en el anexo 1, la corriente generada por el complejo $K_v4.3/\text{DREAM}$ presenta una activación más rápida que la producida por los canales $K_v4.3$ a todos los potenciales de membrana (Tabla 2.4, entradas 1 y 2; anexo 1). De esta manera, el tiempo requerido para alcanzar el valor máximo de la corriente es menor en presencia que en ausencia de DREAM. Además, la formación de dicho complejo también ralentiza la cinética de inactivación característica de los canales $K_v4.3$. Esto es debido a que aunque los valores de las constantes de tiempo de inactivación rápida y lenta de este proceso son similares (Tabla 2.4, entradas 3 y 4; anexo 1), el grado de contribución del componente lento de la inactivación es significativamente mayor en la corriente generada por la activación de canales ensamblados con DREAM que la generada tras la activación de canales $K_v4.3$ solos ($(0.49 \pm 0.04$ vs. $0.36 \pm 0.03)$ en corriente $K_v4.3/\text{DREAM}$ y $K_v4.3$, para $n=20$ y 22 , respectivamente, $p<0.05$). Además, la formación del complejo $K_v4.3/\text{DREAM}$ acelera la

recuperación de la inactivación, lo que se traduce en valores menores de la constante τ_{rec} (Tabla 2.4, entrada 5).

Tabla 2.4. Efectos del derivado **2.9** (3 μM) sobre la cinética de activación, de inactivación y de recuperación de la inactivación en Kv4.3 y Kv4.3/DREAM

| Entrada | | Kv4.3 | Kv4.3 + 2.9 | Kv4.3/DREAM | Kv4.3/DREAM+2.9 |
|---------------------|------------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| ACTIVACIÓN | | | | | |
| 1 | τ_{Act} (ms) +60 mV | 1.01 ± 0.08 | $1.27 \pm 0.13^*$ | 0.68 ± 0.04 | $1.75 \pm 0.27^*$ |
| 2 | τ_{Act} (ms) 0 mV | 3.63 ± 0.34 | $5.07 \pm 0.75^*$ | 2.94 ± 0.23 | $7.60 \pm 1.99^*$ |
| INACTIVACIÓN | | | | | |
| 3 | τ_f (ms) | 22.6 ± 2.8 | 24.4 ± 1.9 | 17.6 ± 2.0 | $35.3 \pm 4.1^*$ |
| 4 | τ_s (ms) | 104.2 ± 20.5 | 134.5 ± 40.1 | 66.9 ± 5.8 | $241.1 \pm 77.9^*$ |
| RECUPERACIÓN | | | | | |
| 5 | τ_{rec} (ms) | 92.7 ± 10.7 | 167.0 ± 43.4 | 35.5 ± 5.1 | $107.9 \pm 10.3^*$ |

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; diferencias significativas en ausencia y en presencia de **2.9**

Con respecto a los efectos del compuesto **2.9** sobre los canales Kv4.3 y Kv4.3/DREAM , cabe destacar que este compuesto ralentiza la cinética de activación (τ_{Act}), tanto en la corriente Kv4.3 como en la generada por la activación de los canales Kv4.3/DREAM . Sin embargo, dicha ralentización es más prominente en el caso de la corriente generada en presencia de DREAM, siendo tres veces más lenta en este caso que en ausencia de DREAM (Tabla 2.4, entradas 1 y 2). En cuanto a la cinética de inactivación, se observa una ralentización en presencia de **2.9**, obteniéndose valores de las constantes de inactivación rápida (τ_f) y lenta (τ_s) mayores que en ausencia de **2.9**, y similares a los obtenidos en el sistema Kv4.3+2.9 (Tabla 2.4, entradas 3 y 4). Por último, **2.9** ralentiza ligeramente la cinética de recuperación de la inactivación de los canales Kv4.3 , mientras que retrasa la cinética de este proceso de forma dramática en los canales Kv4.3/DREAM , lo que se traduce en valores mayores de la constante τ_{rec} (Tabla 2.4, entrada 5).

A la vista del conjunto de estos resultados, se puede concluir que la unión del ligando **2.9** a DREAM modula el efecto funcional del complejo $K_v4.3$ /DREAM y revierte los efectos electrofisiológicos que DREAM produce sobre la corriente, de manera, que los canales $K_v4.3$ /DREAM en presencia de **2.9** exhiben unas propiedades electrofisiológicas similares a las observadas en ausencia de DREAM. Esto sugiere que **2.9** inhibe en este caso concreto, la unión de DREAM al canal $K_v4.3$.

Si se comparan los efectos globales en la electrofisiología del canal producidos por el ligando **2.23** con los producidos por **2.9**, se observa que el primero inhibe de forma más potente tanto los canales $K_v4.3$ como los $K_v4.3$ /DREAM, siendo diez veces más potente que el ligando **2.9**.

Es interesante resaltar, que a diferencia de los dos derivados estudiados en este Capítulo, **2.23** y **2.9**, que son inhibidores de la corriente generada por $K_v4.3$ en presencia o ausencia de DREAM, el derivado **1.83**, obtenido en el Capítulo 1, se comporta como un activador de dichas corrientes a bajas concentraciones. Además, los estudios de mutagenesis dirigida han mostrado que el sitio de unión de dichos derivados es distinto.

2.4.6.2. Modulación de la interacción ATF6/DREAM

Teniendo en cuenta el papel de DREAM en la vía de señalización UPR a través de su interacción con ATF6, se evaluó el efecto del derivado **2.9** en el sistema ATF6/DREAM. Estos estudios se realizaron bajo la dirección del Prof. J. R. Naranjo en el Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).

Inicialmente, se estudió la capacidad del compuesto **2.9** de inhibir la interacción ATF6/DREAM *in vitro*, mediante ensayos de “pull-down”. En este estudio, se incubó GST-DREAM (unida a una resina de sefarosa-glutation) con el fragmento de 367 aa del extremo amino terminal de ATF6- α transducido *in vitro* en un sistema de reticulocitos de conejo o en un lisado de células.¹⁴ Después de incubar y lavar, se eluyó el material unido a la resina y se resolvió en gel de poliacrilamida revelando la presencia de ATF6 con un anticuerpo policlonal para dicha proteína. Como se observa en la Figura 2.18 la unión del extremo N-terminal de ATF6 a GST-DREAM disminuye en presencia del derivado **2.9** (200nM). Además, en este ensayo **2.9** inhibe la interacción ATF6/DREAM de manera más efectiva que repaglinida (**1.1**).

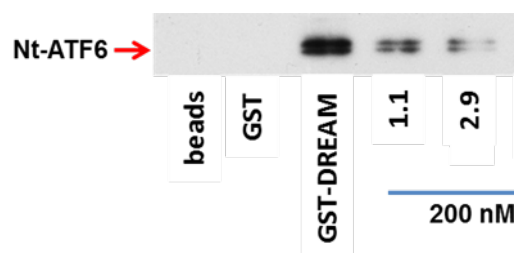


Figura 2.18. Resultados de los experimentos de “pull-down” para determinar la capacidad de inhibición de la interacción ATF6/DREAM del derivado **2.9**

Como se ha comentado en apartados anteriores, la interacción DREAM con ATF6 impide el procesamiento de ATF6 y su translocación al núcleo. Por lo tanto se estudió si el compuesto **2.9** tenía capacidad para alterar la transactivación dependiente de ATF6, mediante la medida de la actividad de la luciferasa en células de neuroblastoma de ratón N2A en condiciones de estrés de retículo endoplasmático (RE). Para inducir el estrés, las células se trataron con tunicamicina, un inhibidor de la glicosidación del RE. En este estudio se analizó la actividad luciferasa como una medida de la actividad transcripcional ejercida sobre el reportero con 5 sitios de unión para ATF6 (p5xATF6-GL3) en presencia de tunicamicina (T) y/o **2.9** en células de neuroblastoma N2A. Como se muestra en la Figura 2.19, el compuesto **2.9** modifica la transactivación dependiente de ATF6 de manera concentración-dependiente. La concentración efectiva calculada para **2.9** en este proceso fue de $EC_{50} = 43.7$ nM. De este estudio, se puede concluir que el derivado **2.9** se une a DREAM impidiendo la formación del complejo ATF6/DREAM, lo que da lugar a un aumento en la acumulación de ATF6 (N-terminal) en el núcleo y a una activación de las funciones del sistema UPR.

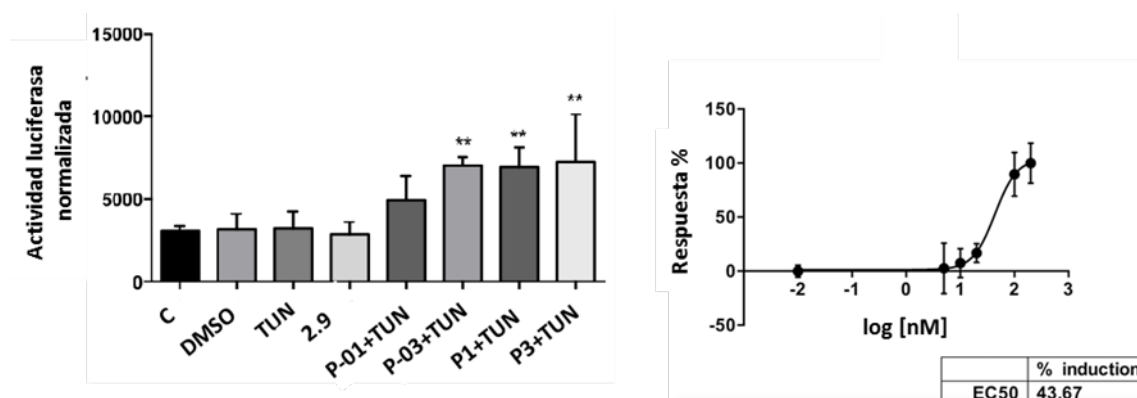


Figura 2.19. Resultados del ensayo de luciferasa en células de neuroblastoma N2A transfectadas de manera transitoria con plásmido reportero p5xATF6-GL3 y estimuladas con tunicamicina (TUN, 200 ng/ml) y con concentraciones crecientes de **2.9** (0.1-3 nM). ** $P < 0.01$ vs células estimuladas solo con tunicamicina. (One-way ANOVA, Dunnett's post-test).

Si se comparan los datos obtenidos para el ligando **2.9** (43.7 nM) y repaglinida (80 nM), se observa que ambos compuestos presentan una concentración efectiva del mismo orden, siendo el derivado **2.9** un ligando de DREAM con mayor capacidad para activar la transactivación dependiente de ATF6.

2.4.7. Estudio del paso de la barrera hematoencefálica por el método PAMPA

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura constituida por células endoteliales que recubren el sistema vascular cerebral. Su importancia radica en el mantenimiento de la homeostásis de las neuronas y células gliales, así como en el bloqueo del acceso de sustancias nocivas. Aunque la BHE desempeña una función protectora, también es cierto que obstaculiza la llegada de sustancias con fines terapéuticos al cerebro de ahí que constituya un escollo para el tratamiento de la mayoría de enfermedades neurodegenerativas.

Los sistemas implicados en el transporte a través de la BHE incluyen el transporte pasivo, la difusión facilitada por transportadores y el transporte activo. Dado que la mayor parte de los fármacos penetran al sistema nervioso (SN) mediante difusión pasiva, se estudió si el compuesto **2.9** era capaz de atravesar la BHE. Para ello se mimetizó *in vitro* la BHE mediante el ensayo de PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*).

De acuerdo con los valores descritos en la bibliografía para la permeabilidad efectiva, los compuestos con una $Pe > 4 \times 10^{-6}$ cm/s atravesarán la BHE.²⁴ Cuando $Pe < 2 \times 10^{-6}$ cm/s la permeabilidad será baja y si $Pe = 2-4 \times 10^{-6}$ cm/s, la permeabilidad será dudosa.

En el estudio, se empleó como control positivo verapamilo, un compuesto con una elevada permeabilidad, y como negativo la teofilina, una sustancia incapaz de atravesar la BHE. El derivado **2.9** se evaluó en dos ensayos independientes por triplicado a una concentración de 50 µg/ml. En la Figura 2.20, se muestra la permeabilidad efectiva (Pe) para los controles y el derivado **2.9**. Como era de esperar, el verapamilo presentó un valor de $Pe > 4 \times 10^{-6}$ cm/s, por lo que atravesaría la BHE. Sin embargo, en la teofilina el dato fue de 0.001×10^{-6} (cm/s), por lo que no pasaría al cerebro. El derivado **2.9** mostró paso de BHE por difusión pasiva con un Pe de 6.35×10^{-6} (cm/s) y un porcentaje de permeabilidad del 48%, indicativo de una buena permeabilidad.

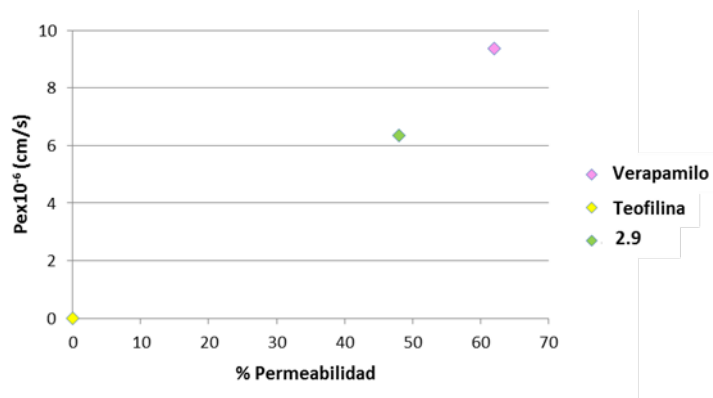


Figura 2.20. Permeabilidad efectiva experimental del derivado 2.9

2.4.8. Estudios *in vivo* en un modelo de la Enfermedad de Huntington. Ensayo de coordinación motora y aprendizaje

Dado los buenos resultados de **2.9** y **2.23** en los estudios de la modulación de las interacciones Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM se decidió evaluar su efecto *in vivo* en ratones R6/1, un modelo de la Enfermedad de Huntington. Estos estudios se realizaron bajo la dirección del Prof. J. R. Naranjo en el Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).

Para evaluar la eficacia de los derivados obtenidos en el transcurso de esta tesis en los trastornos motores y de memoria, **2.9** y **2.23** se administraron de forma crónica en la bebida de los ratones R6/1 a partir de las 8 semanas de vida. Como control, se utilizó un grupo de ratones R6/1 que recibieron en el agua de bebida sólo vehículo (concentración de DMSO necesaria para solubilizar los compuestos). Los ensayos realizados han sido de control motor (Rota-rod) y memoria (Ensayo de reconocimiento de objeto nuevo).

2.4.8.1. Ensayo de coordinación motora en Rota-Rod

Los ratones de los genotipos salvaje (WT) y R6/1 se sometieron a dos sesiones previas de toma de contacto con el equipo y aprendizaje el día anterior al experimento. En las sesiones de aprendizaje la velocidad de giro fue constante y lenta (4 revoluciones por minuto). El día del experimento, la velocidad de giro fue creciente haciendo una rampa de 4 a 40 rpm en 60 segundos. La caída del ratón de la plataforma giratoria corta automáticamente el cronometraje del tiempo y establece la variable tiempo de latencia que se usa como registro para cada animal. Normalmente, los

ensayos de coordinación motora se realizaron a distintos tiempos para medir la progresividad del deterioro motor en los ratones R6/1.

Como se observa en la Figura 2.21.A, los ratones R6/1 no tratados (DMSO) muestran un fenotipo de problemas motores a las 12 semanas, con reducción en el tiempo de latencia, que los WT no presentaron. Estos problemas motores se agudizan a las 20 semanas (Figura 2.21.B, DMSO). Con respecto al tratamiento (Figura 2.21.A), se observa que el fenotipo de problemas motores se revierte a las 12 semanas de tratamiento con repaglinida (RP, **1.1**), **2.9** y **2.23**, ya que en los ratones R6/1 tratados aumenta el tiempo de latencia con respecto a los no tratados. Sin embargo, a las 20 semanas los problemas de coordinación motora son muy severos y el tratamiento con los compuestos no es capaz de revertirlo (Figura 2.21.B).

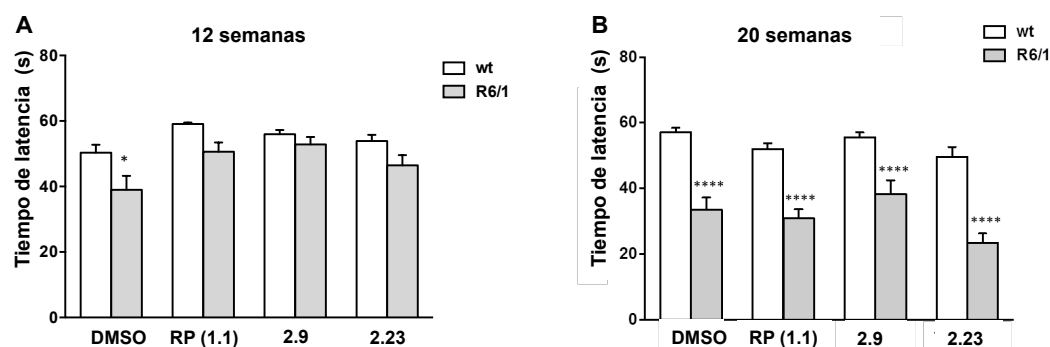


Figura 2.21. Resultados del efecto de los compuestos repaglinida (**1.1**), **2.9** y **2.23** en el ensayo de coordinación motora Rota-Rod en ratones R6/1 a las 12 (A) y 20 (B) semanas de vida

2.4.8.2. Ensayo de memoria: test de reconocimiento de objeto nuevo

El ensayo de memoria utilizado en este caso fue el test de reconocimiento de objeto nuevo que consiste en la exposición de los ratones ante objetos nuevos y ya explorados para evaluar su capacidad de discriminación ante los mismos. Este Test se realiza durante 3 días consecutivos. El primer día, denominado también fase de familiarización, los ratones se colocan ante dos objetos idénticos (Ta y Tc) durante 5 minutos.

En el segundo día, se evalúa su memoria a corto plazo. Para ello, en primer lugar se coloca a los ratones frente a los mismos objetos del día anterior durante el mismo tiempo. A las 4 horas, se sustituye uno de los objetos por uno nuevo (Tc). De esta manera, cada ratón volverá a evaluarse durante 5 minutos anotándose el tiempo que exploran el objeto nuevo (Tc) y el objeto ya explorado (Ta). Los ratones

que no muestren interés en los objetos y no los exploran por al menos 2 segundos son excluidos del ensayo. Tras registrar los tiempos de exploración a uno y otro objeto se calcula el Índice de Discriminación (D.I.) de acuerdo con la fórmula:

$$D.I. = (T_c - T_a) / (T_c + T_a)$$

El tercer día, se evalúa la memoria a largo plazo (24 h). Para este fin, se coloca un objeto ya explorado (T_a) y otro nuevo (T_n). A continuación se cronometra el tiempo de exploración durante 5 minutos y se calcula el D.I. Como en el ensayo de memoria a corto plazo, se excluyen aquellos ratones cuyo tiempo total de exploración no supera los 2 segundos.

En la Figura 2.22, se recogen los resultados obtenidos en los ensayos de memoria a corto (A) y largo plazo (B) para los ratones R6/1 tratados con **2.9**, **2.23** y repaglinida (**1.1**). A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el fenotipo de pérdida de memoria a corto plazo presente en los ratones R6/1 no tratados es revertido por **2.9** y **2.23**. Sin embargo, los ratones tratados con repaglinida (**1.1**) no presentan ninguna mejora en los problemas de memoria a corto plazo. Con respecto a la memoria a largo plazo, sólo el tratamiento con **2.23** revierte el fenotipo de problemas de memoria presente en los ratones R6/1.

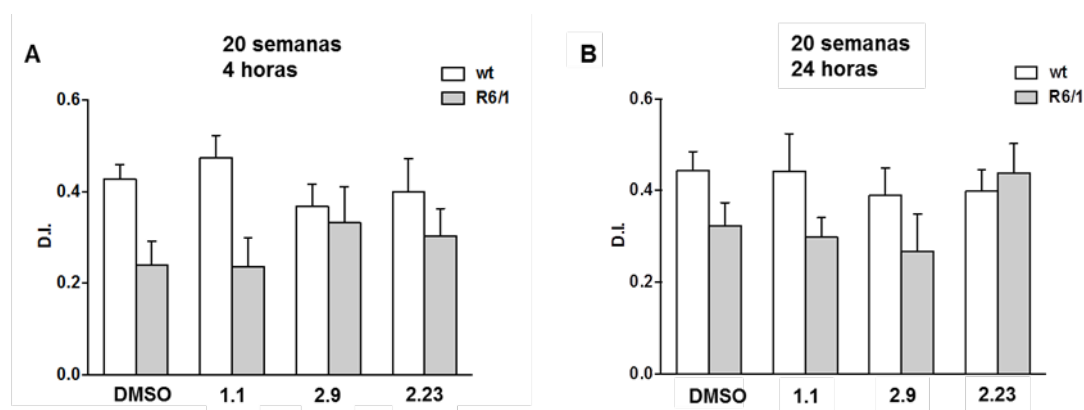


Figura 2.22: Resultados del ensayo de memoria (A) a corto plazo y (B) a largo plazo en ratones WT, R6/1 no tratados y tratados con repaglinida (**1.1**), **2.9** y **2.23**

2.5. CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes del presente capítulo, que ha tenido como objetivo principal la búsqueda de ligandos de DREAM como herramientas farmacológicas para el estudio de las interacciones Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM, y su aplicación a la enfermedad de Huntington, conducen a las siguientes conclusiones:

1.- Se han generado modelos por homología de la proteína hDREAM que han resultado herramientas valiosas para el cribado de una quimioteca virtual mediante estudios de docking molecular. Estos estudios permitieron seleccionar una serie de compuestos como candidatos para interactuar con la proteína DREAM.

2.- Se han desarrollado dos series de derivados de fenilacetamidas que presentan una capacidad de interacción con DREAM superior a los prototipos de partida.

3.- Mediante estudios de mutagenesis dirigida se ha validado experimentalmente el sitio de unión de los nuevos ligandos a DREAM previamente propuesto por el estudio de docking. Este sitio es un bolsillo hidrófobo donde las tirosinas 118 y 130 son claves para la interacción con los ligandos.

4.- Se ha estudiado el efecto de los mejores ligandos de DREAM, **2.9** y **2.23**, en la modulación de los complejos Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM.

4a. Los estudios de electrofisiología han permitido identificar que **2.9** y **2.23** son inhibidores de las corrientes generadas por los canales Kv4.3 en presencia o ausencia de DREAM, siendo el derivado **2.23** más potente que el derivado **2.9**.

4b. Con respecto al complejo ATF6/DREAM, se ha identificado el derivado **2.9** como un inhibidor de dicha interacción, que modifica la transactivación dependiente de ATF6 de manera concentración-dependiente. Esta inhibición da lugar a un aumento en la acumulación de ATF6 en el núcleo y a una activación de las funciones del sistema UPR.

5. Estudios *in vivo* en un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington tratado con los derivados **2.9** y **2.23**, han demostrado que:

5a. Tanto **2.9** como **2.23**, revirtieron las deficiencias motoras observadas a las 12 semanas de tratamiento. Sin embargo, ninguno de los dos compuestos pudo revertir dichos problemas a las 20 semanas de tratamiento. Este comportamiento fue igual al observado para el prototipo repaglinida.

5b. Tanto **2.9** como **2.23** revirtieron el fenotipo de pérdida de memoria a corto plazo. Sin embargo, sólo el derivado **2.23** fue capaz de revertir el fenotipo de pérdida de memoria a largo plazo. En estos ensayos, el prototipo repaglinida no fue capaz de revertir dichos fenotipos.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

1. Buxbaum, J. D.; Choi, E.-K.; Luo, Y.; Lilliehook, C.; Crowley, A. C.; Merriam, D. E.; Wasco, W. Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1177-1181.
2. Mikhaylova, M.; Hradsky, J.; Kreutz, M. R. Between promiscuity and specificity: novel roles of EF-hand calcium sensors in neuronal Ca²⁺ signalling. *J. Neurochem.* **2011**, *118*, 695-713.
3. Gifford, J. L.; Walsh, M. P.; Vogel, H. J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* **2007**, *405*, 199-221.
4. (a) Craig, T. A.; Benson, L. M.; Venyaminov, S. Y.; Klimtchuk, E. S.; Bajzer, Z.; Prendergast, F. G.; Naylor, S.; Kumar, R. The metal-binding properties of DREAM. Evidence for calcium-mediated changes in DREAM structure. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10955-10966; (b) Osawa, M.; Dace, A.; Tong, K. I.; Valiveti, A.; Ikura, M.; Ames, J. B. Mg²⁺ and Ca²⁺ Differentially Regulate DNA Binding and Dimerization of DREAM. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18008-18014; (c) Pham, K.; Miksovska, J. In Spectroscopic study Ca²⁺ induced changes in the structure, dynamics and stability of DREAM protein and its mechanism of DNA interaction. *Am. Chem. Soc.* **2012**; pp SERM-497; (d) Pham, K.; Dhulipala, G.; Gonzalez, W. G.; Gerstman, B. S.; Regmi, C.; Chapagain, P. P.; Miksovska, J. Ca²⁺ and Mg²⁺ modulate conformational dynamics and stability of downstream regulatory element antagonist modulator. *Protein. Sci.* **2015**, *24*, 741-751.
5. Yu, L.; Sun, C.; Mendoza, R.; Wang, J.; Matayoshi, E. D.; Hebert, E.; Pereda-Lopez, A.; Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T. Solution structure and calcium-binding properties of EF-hands 3 and 4 of calsenilin. *Protein. Sci.* **2007**, *16*, 2502-2509.
6. Lusin, J. D.; Vanarotti, M.; Dace, A.; Li, C.; Valiveti, A.; Ames, J. B. NMR Structure of DREAM: Implications for Ca²⁺-Dependent DNA Binding and Protein Dimerization. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2252-2265.
7. Scannevin, R. H.; Wang, K.; Jow, F.; Megules, J.; Kopsco, D. C.; Edris, W.; Carroll, K. C.; Lue, Q.; Xu, W.; Xu, Z.; Katz, A. H.; Olland, S.; Lin, L.; Taylor, M.; Stahl, M.; Malakian, K.; Somers, W.; Mosyak, L.; Bowlby, M. R.; Chanda, P.; Rhodes, K. J. Two N-terminal domains of Kv4 K⁺ channels regulate binding to and modulation by KChIP1. *Neuron* **2004**, *41*, 587-598.

8. Liang, P.; Wang, H.; Chen, H.; Cui, Y.; Gu, L.; Chai, J.; Wang, K. Structural Insights into KChIP4a Modulation of Kv4.3 Inactivation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4960-4967.
9. (a) An, W. F.; Bowlby, M. R.; Betty, M.; Cao, J.; Ling, H.-P.; Mendoza, G.; Hinson, J. W.; Mattsson, K. I.; Strassle, B. W.; Trimmers, J. S.; Rhodes, K. J. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **2000**, *403*, 553-556; (b) Wang, H.; Yan, Y.; Liu, Q.; Huang, Y.; Shen, Y.; Chen, L.; Chen, Y.; Yang, Q.; Hao, Q.; Wang, K.; Chai, J. Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 32-39.
10. Pioletti, M.; Findeisen, F.; Hura, G. L.; Minor, D. L. Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 987-995.
11. Zhou, W.; Qian, Y.; Kunjilwar, K.; Pfaffinger, P. J.; Choe, S. Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K⁺ channels. *Neuron* **2004**, *41*, 573-586.
12. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7 Schrödinger, LLC.
13. (a) Beck, E. J.; Bowlby, M.; An, W. F.; Rhodes, K. J.; Covarrubias, M. Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. *J. Physiol.* **2002**, *538*, 691-706; (b) Holmqvist, M. H.; Cao, J.; Knoppers, M. H.; Jurman, M. E.; Distefano, P. S.; Rhodes, K. J.; Xie, Y.; An, W. F. Kinetic modulation of Kv4-mediated A-current by arachidonic acid is dependent on potassium channel interacting proteins. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 4154-4161; (c) Holmqvist, M. H.; Cao, J.; Hernandez-Pineda, R.; Jacobson, M. D.; Carroll, K. I.; Sung, M. A.; Betty, M.; Ge, P.; Gilbride, K. J.; Brown, M. E.; Jurman, M. E.; Lawson, D.; Silos-Santiago, I.; Xie, Y.; Covarrubias, M.; Rhodes, K. J.; Distefano, P. S.; An, W. F. Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 1035-1040.
14. Naranjo, J. R.; Zhang, H.; Villar, D.; Gonzalez, P.; Dopazo, X. M.; Moron-Oset, J.; Higuera, E.; Oliveros, J. C.; Arrabal, M. D.; Prieto, A.; Cercos, P.; Gonzalez, T.; De, I. C. A.; Casado-Vela, J.; Rabano, A.; Valenzuela, C.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Li, J.-Y.; Mellstrom, B. Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 627-638.
15. SiteMap, versión 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
16. Schrödinger Suite 2011 Induced Fit Docking protocol; Glide version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011; Prime version 3.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
17. (a) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-83; (b) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. Recent applications of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633-9695; (c) Miyaura, N. Cross-Coupling Reactions, A Practical Guide, *Top. Curr. Chem.* **2002**; Vol. 219; p 11. Springer-Verlag, Berlin; (d) Suzuki, A., In *Handbook of Organopalladium Chemistry for organic Synthesis*, Negishi, E., de Meijere, A., Eds., Wiley-Interscience: New York, (2002); Vol. 1, Chapter III, p. 249; (e) Bellina, F.; Carpita, A.; Rossi, R. Palladium catalysts for the

Suzuki cross-coupling reaction: An overview of recent advances. *Synthesis* **2004**, 2419-2440; (f) Fihri, A.; Bouhrara, M.; Nekoueishahraki, B.; Basset, J.-M.; Polshettiwar, V. Nanocatalysts for Suzuki cross-coupling reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5181-5203.

18. Farina, V.; Krishnan, B. Large rate accelerations in the stille reaction with tri-2-furylphosphine and triphenylarsine as palladium ligands: mechanistic and synthetic implications. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9585-9955.

19. (a) Leadbeater, N. E. Fast, easy, clean chemistry by using water as a solvent and microwave heating: the Suzuki coupling as an illustration. *Chem. Commun.* **2005**, 2881-2902; (b) Leadbeater, N. E.; Williams, V. A.; Barnard, T. M.; Collins, M. J. Solvent-free, open-vessel microwave-promoted Heck couplings: from the mmol to the mol scale. *Synlett* **2006**, 2953-2958; (c) Arvela, R. K.; Leadbeater, N. E. Microwave-promoted Heck coupling using ultralow metal catalyst concentrations. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1786-1790.

20. Pierre Genet, J.; Savignac, M. Recent developments of palladium (0) catalyzed reactions in aqueous medium. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 576, 305-317.

21. (a) Shimizu, K.; Maruyama, R.; Komai, S.; Kodama, T.; Kitayama, Y. Pd-sepiolite catalyst for Suzuki coupling reaction in water: Structural and catalytic investigations. *J. Catal.* **2004**, 227, 202-209; (b) Badone, D.; Baroni, M.; Cardamone, R.; Ielmini, A.; Guzzi, U. Highly Efficient Palladium-Catalyzed Boronic Acid Coupling Reactions in Water: Scope and Limitations. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7170-7173.

22. Dyer, U. C.; Shapland, P. D.; Tiffin, P. D. Preparation of enantiopure 4-arylmandelic acids via a Pd/C-catalysed Suzuki coupling of enantiopure 4-bromomandelic acid. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1765-1767.

23. Arnold, K.; Davies, B.; Giles, R. L.; Grosjean, C.; Smith, G. E.; Whiting, A. To catalyze or not to catalyze? Insight into direct amide bond formation from amines and carboxylic acids under thermal and catalyzed conditions. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 813-820.

24. Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 223-232.

CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo recogido en la presente Memoria ha tenido como objetivo general la búsqueda de nuevas entidades moleculares como herramientas farmacológicas para estudiar la red de interacciones proteína-proteína de DREAM, fundamentalmente en su interacción con el canal de potasio $K_v4.3$ y con el factor de transcripción ATF6, ambas implicadas en diversos procesos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Huntington. Estas nuevas entidades moleculares contribuirían a la validación de DREAM como nueva diana terapéutica para la búsqueda de fármacos útiles en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Al inicio de esta Tesis, no se había descrito ninguna molécula capaz de unirse a DREAM y modular su red de interacciones proteína-proteína. El trabajo desarrollado en esta Tesis ha permitido la identificación de moduladores del sensor neuronal de calcio DREAM, siguiendo para ello dos estrategias químico-médicas distintas y complementarias, una basada en la estructura de ligandos conocidos de proteínas homólogas a DREAM, y otra basada en la estructura 3D de DREAM.

Aplicando la primera estrategia, se identificó un cabeza de serie, a partir del cual se realizaron modificaciones estructurales que llevaron a establecer las primeras relaciones estructura-actividad, definiendo los requisitos estructurales necesarios para la unión de los compuestos a DREAM. La posterior optimización del cabeza de serie ha permitido la obtención de nuevos ligandos de DREAM más potentes que el prototipo de partida. Además, mediante el estudio de electrofisiología del ligando más potente, se ha identificado un activador de la corriente generada por el canal de potasio $K_v4.3$. Hasta la fecha, sólo se conocen dos activadores de dicho canal, el compuesto descrito en esta Memoria y NS5809. De hecho, este resultado es de gran importancia terapéutica y podría establecer las bases para el desarrollo de potenciales fármacos para el tratamiento de ciertas patologías, tanto neuronales (epilepsia) como cardíacas (arritmias cardíacas), en las que se ha demostrado una regulación a la baja de $K_v4.3$.

En cuanto a la segunda estrategia, mediante una aproximación multidisciplinar, que implica diseño asistido por ordenador, síntesis orgánica, ensayos *in vitro*, estudios de mutagénesis dirigida, ensayos *in cellulo* y estudios *in vivo*, se han identificado dos inhibidores de los complejos Kv4.3/DREAM y ATF6/DREAM con potencial aplicación en la Enfermedad de Huntington, lo que abre una nueva vía para la búsqueda de tratamientos eficaces para dicha enfermedad.

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

1. Generalidades

Todos los productos de partida, reactivos y disolventes se adquirieron con alto grado de pureza en Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, SDS, Lab-Scan, Apollo, cymit y Activate scientific.

El curso de las reacciones se siguió por medio de cromatografía en capa fina (c.c.f.) con cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60F-254), de un espesor de capa de 0.2 mm y se visualizaron con luz ultravioleta (254 nm y/o a 365 nm), mediante pulverización con solución etanólica al 5% de ninhidrina o con una solución etanólica al 10% de ácido molibdofosfórico (PMA).

Para la síntesis de ureas y amidas sustituidas, se empleó THF anhidro que se preparó mediante técnicas habituales (D. D Perrin, W. L. Armarego, D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press: Oxford. 2ª Ed., 1980).

Para las reacciones con agentes de acoplamiento, se empleó DMF anhidra comercial.

Las reacciones de acoplamiento con paladio se llevaron a cabo en condiciones inertes, bajo atmósfera de argón, en un reactor de microondas Initiator™ de Biotage®.

La separación y purificación de los productos de reacción se realizó por cristalización, por trituración con el solvente apropiado o por cromatografía de media presión (flash). Las separaciones por cromatografía se realizaron con gel de sílice 60 Merck con un tamaño de grano de 230-400 ASTM y con cartuchos de gel de sílice de 12 o 25 g (Biotage o Varian, tamaño de partícula de 60 µm). En el caso de fase reversa se utilizaron los cartuchos SNAP KP C18-HS de 12 g. Los eluyentes empleados y la relación v/v se indican en cada caso.

Los productos aislados se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (HPLC-MS), espectrometría de masas de alta resolución y/o análisis elemental. La pureza de todos los productos que se evaluaron in vitro o in vivo fue ≥95% en todos los casos, según se determinó por HPLC y RMN.

Los espectros de ¹H- y ¹³C-RMN se determinaron en los espectrómetros Bruker-AVANCE 300, Bruker-AVANCE III HD 400, Varian-INOVA 400, Varian-MERCURY 400 y Varian UNITY 500 utilizando dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d₆) como

disolvente. Los espectros monodimensionales se obtuvieron en condiciones estándar. Los desplazamientos químicos (δ) se han expresado en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). La multiplicidad de las señales se ha abreviado de la siguiente forma: s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), q (quintuplete), sx (sextuplete), dd (doble doblote), dt (doble triplete), td (triple doblote), tt (triple triplete), m (multiplete), bs (banda ancha). Los espectros bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC) se registraron con la misma anchura espectral en el dominio de protón (6000 Hz) y de carbono (30000 Hz); y un tiempo de espera de 1 s. Para el experimento de HSQC y HMBC los datos se procesaron en una matriz de 4098 x 2048 puntos.

Los cromatogramas HPLC analíticos se registraron en un equipo Waters con una columna Sunfire C18 (3.5 μ m, 4.6 mm x 50 mm), un flujo de 1mL/min y un gradiente de A (CH₃CN) en B (H₂O) con un 0.05% de TFA como aditivo. La detección de picos se realizó a 254 nm.

Los cromatogramas HPLC-MS se obtuvieron en un equipo Waters 2695 acoplado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ. La separación se realizó con una columna Sunfire C18 (3.5 μ m, 4.6 mm x 50 mm), un flujo de 1mL/min y como fase móvil, un gradiente de A (CH₃CN) en B (H₂O) con un 0.1% de ácido fórmico como aditivo. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando la técnica de ionización por electrospray ESI. Los picos correspondientes al ión molecular más una unidad se han indicado como ([M+H]⁺).

Las masas exactas se realizaron en un equipo 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS de Agilent Technologies. El flujo utilizado fue de 200 μ L/min con una inyección directa de 5 μ l de producto en metanol. La ionización se consiguió mediante la técnica ESI, con un voltaje de 4500 V, un fragmentador de 150 V y un Skimmer de 85 V.

Los análisis elementales se realizaron en un analizador Heareus CHN-O-RAPID. Los valores comprendidos en el rango ± 0.4 % respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares se consideran satisfactorios.

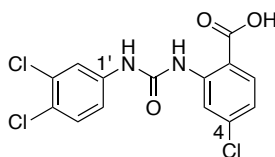
Los productos finales obtenidos fueron liofilizados en un equipo telstar LyoQuest-85 o cristalizados (el disolvente o mezcla de disolventes se indica en cada caso).

2. Procedimientos generales de síntesis

2.1. Capítulo 1

2.1.1. Síntesis del ácido 4-cloro-2-[3-(3,4-diclorofenil)carbamoilamino]benzoico CL-888 (1.2)

Sobre una disolución del isocianato de 3,4-diclorofenilo (1 g, 5.32 mmol) en 25 mL de THF anhidro, se añade, bajo atmósfera de argón, una disolución del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (870 mg, 5.07 mmol) en 25 mL de THF anhidro. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se elimina a presión reducida. Se adiciona agua (10 mL) y se acidifica con HCl 1N a pH 3 o 4. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x10 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de media presión con una mezcla de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyentes, obteniéndose 0.8 g de un sólido amorfo blanco (Rdto. 43%).



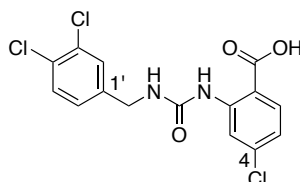
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 6.94 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.45-7.49 (m, 2H, H_{5',6'}), 7.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₆), 8.36 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 10.09 (s, 2H, NH), 12.61-13.02 (bs, CO₂H). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 117.8 (C₃), 118.6 (C_{6'}), 119.7 (C₅), 119.9 (C_{2'}), 120.8 (C₁), 122.9, 130.2 (C_{5'}), 130.7 (C_{4'}), 132.7 (C₆), 135.0 (C_{3'}), 140.4, 142.6, 152.4 (NHCONH), 169.6 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 5.66 min. **LC-MS**: 359.3 ([M+H]⁺). **HRMS** (EI⁺) *m/z* encontrada 357.9689 ([M]⁺ C₁₄H₉N₂O₃Cl₃ calculada 357.9679).

2.1.2. Síntesis de los prototipos 1.5-1.7

Ácido 4-cloro-2-[3-(3,4-diclorobencil)carbamoilamino]benzoico, (1.5)

Sobre una disolución del correspondiente isocianato de 3,4-diclorobencilo (300 mg, 1.48 mmol) en 9 mL de THF anhidro, se añade, bajo atmósfera de argón, una disolución del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (243 mg, 1.41 mmol) en 6 mL de THF

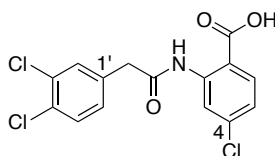
anhidro. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se elimina a presión reducida. Se adiciona agua (10 mL) y se acidifica con HCl 1N a pH 3 o 4. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x10 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de media presión con una mezcla de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose 150 mg de un sólido amorfo blanco (Rdto. 32%).



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4.25 (s, 1H, CH₂NH), 4.26 (s, 1H, CH₂NH), 6.87 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H, H₅), 7.30 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H, H_{6'}), 7.53 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H_{2'}), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₆), 8.00 (s, 1H, NH), 8.41 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₃), 12.06-12.28 (bs, CO₂H). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 45.8 (CH₂NH), 117.7 (C₃), 119.6 (C₅₋₁), 128.1 (C_{6'}), 129.5 (C_{4'}), 129.6 (C_{2'}), 130.8 (C_{5'}), 131.2 (C_{3'}), 133.3 (C₆), 135.9 (C_{1'}), 142.3 (C₄), 144.0 (C₂), 155.5 (NHCONH), 170.0 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 3.96 min. **LC-MS**: 373.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 371.9826 ([M]⁺ C₁₅H₁₁N₂O₃Cl₃ calculada 371.9835).

Ácido 4-cloro-2-[2-(3,4-diclorofenil)-acetilamino]benzoico, (1.6)

A una disolución de ácido 3,4-diclorofenilacético (504 mg, 3.04 mmol) en 12 mL de THF anhidro a 0°C, se adiciona (COCl)₂ (575 μ L, 8 mmol) y una gota de DMF como catalizador. La mezcla de reacción se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente a presión reducida. Sobre la solución del cloruro de ácido formado en 12 mL de THF anhidro se adiciona a 0°C ácido 2-amino-4-clorobenzoico (348 mg, 2.03 mmol) y Et₃N anhidra (1 mL, 8 mmol). La reacción se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a vacío y se neutraliza o acidifica hasta pH 3 o 4 con HCl 1N en función de la ausencia o presencia del grupo ácido. El crudo de reacción se extrae con AcOEt (3x10 mL) y se lava con disolución saturada de NaCl (30 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra a vacío. El residuo obtenido se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente, obteniéndose 518.2 mg de un sólido amorfo blanco (518.2 mg). (Rdto. 73%).

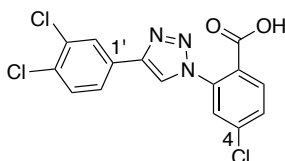


¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.83 (s, 2H, CH₂CO), 7.16 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.33 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H₆'), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.62 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 7.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 8.61 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.24 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43.0 (CH₂CO), 114.8 (C₁), 119.1 (C₃), 122.5 (C₅), 129.8 (C_{4'}), 129.9 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 131.0 (C_{3'}), 131.7 (C_{2'}), 132.6 (C₆), 135.3 (C_{1'}), 138.5 (C₄), 141.6 (C₂), 168.7 (CO₂H), 168.9 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 7.61 min. **LC-MS**: 358.5 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 356.9718 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₃ calculada 356.9726).

Ácido 4-cloro-2-[4-(3,4-diclorofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]benzoico, (1.7)

A una solución fría de ácido 2-amino-4-clorobenzoico (150 mg, 0.87 mmol) en 8 mL de HCl al 18%, se adicionan gota a gota 3 mL de una solución acuosa de NaNO₂ (84 mg, 1.22 mmol). La reacción se agita durante 20 min. Transcurrido el tiempo de agitación, se añaden gota a gota 3 mL de una solución acuosa de NaN₃ (80 mg, 1.22 mmol). En un baño de hielo, la mezcla de reacción se acidifica con NH₄OH al 32% hasta pH = 3 o 4 y se deja que alcance la temperatura ambiente. Tras 1 h de agitación, el precipitado se filtra y se lava con agua, obteniéndose 143 mg del ácido 2-azido-4-clorobenzoico.

Sobre una mezcla de 3,4-diclorofenilacetileno (143 mg, 0.72 mmol) y 2-azido-4-clorobenzoico (124 mg, 0.72 mmol) se adiciona, bajo atmósfera de argón, una solución de CuSO₄·5H₂O (10 mg, 0.02 mmol), AscNa (12.9 mg, 0.04 mmol) y PhCO₂H (16.8 mg, 0.20 mmol) en 2 mL de *tert*-butanol:agua (1:2). Tras 20 h de reacción, la fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL), los extractos orgánicos se lavan con una disolución saturada de NaCl (30 mL) y se seca sobre Na₂SO₄. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica por cristalización en MeOH, obteniéndose 80 mg (30%) de **1.7** como un sólido amarillento.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{5'}), 7.81 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, H₅), 7.92 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, H_{6'}), 7.95 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H_{2'}), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H₃), 9.19 (s, 1H, CH_{cic}). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 124.2 (C_{2'}), 125.2 (C_{6'}), 126.5 (CH_{cic}), 126.8, 127.4 (C₃), 130.3, 130.5, 131.0 (C_{5'}), 131.5 (C₅), 131.9 (C₆), 132.3, 136.2, 136.7, 144.2 (C₂), 166.7 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): t_R = 3.82 min. **LC-MS**: 368.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 366.9682 ([M]⁺ C₁₅H₈N₃O₂Cl₃ calculada 366.9682).

2.1.3. Síntesis de amidas

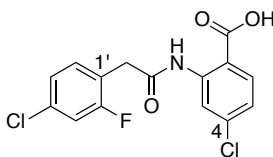
Método A. A una disolución del correspondiente ácido carboxílico (1.0 equiv) en THF anhidro (4 mL/mmol) a 0°C, se adiciona (COCl)₂ (2.4 equiv) y una gota de DMF como catalizador. La mezcla de reacción se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente a presión reducida. Sobre una solución del cloruro de ácido formado en THF anhidro (4 mL/mmol), se adiciona a 0°C la amina correspondiente (1.1 equiv) y Et₃N anhidra (3.0 equiv). La reacción se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a vacío y se neutraliza o acidifica hasta pH 3 o 4 con HCl 1N en función de la ausencia o presencia del grupo ácido. El crudo de reacción se extrae con AcOEt (3x10 mL) y se lava con disolución saturada de NaCl (30 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra a vacío. El residuo obtenido se purifica como se especifica en cada caso.

Método C. Una disolución del correspondiente ácido carboxílico (1.5 equiv) en SOCl₂ (2 mL/mmol) como disolvente, se calienta a reflujo durante 6 h. Transcurrido el tiempo de reacción, el exceso de SOCl₂ se elimina a presión reducida. Sobre la disolución del cloruro de ácido formado en THF anhidro (2 mL/mmol) se adiciona la amina correspondiente (1.0 equiv) y óxido de propileno (15.0 equiv). La reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. El disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se extrae con AcOEt (3x10 mL) y se lava con disolución saturada de NaCl (30 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra a vacío. El residuo obtenido se purifica como se especifica en cada caso.

Ácido 4-cloro-2-[2-(4-cloro-2-fluorofenil)acetilamino]benzoico, (1.20)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (172 mg, 1.00 mmol) y el ácido 4-cloro-2-fluorofenilacético (172 mg, 0.91 mmol) siguiendo el procedimiento

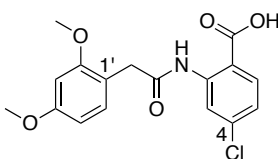
general 2.1.3, método A. El producto **1.20** se aísla por un proceso de trituración con metanol como solvente. Sólido amorfo blanco (76.6 mg). Rdto. 24%.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.88 (s, 2H, CH₂CO), 7.22 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.21-7.28 (m, 1H, H_{5'}), 7.30-7.40 (m, 2H, H_{3',6'}), 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 8.60 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.17 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 48.2 (CH₂CO), 114.7 (d, *J* = 11.3 Hz, C_{1'}), 115.1 (C₁), 115.8 (d, *J* = 21.7 Hz, C_{3'}), 119.2 (C₃), 122.7 (C₅), 126.2 (d, *J* = 2.9 Hz, C_{5'}), 132.7 (C₆), 133.8 (d, *J* = 11.3 Hz, C_{6'}), 138.4 (C₄), 138.6 (d, *J* = 9.0 Hz, C_{4'}), 141.5 (C₂), 162.0 (d, *J* = 247.0 Hz, C_{2'}), 168.6 (CH₂CO), 168.9 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 3.95 min. **LC-MS**: 342.3 ([M+H]⁺). **HRMS** (EI⁺) *m/z* encontrada 341.0022 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₂F calculada 341.0022).

Ácido 4-cloro-2-[2-(2,4-dimetoxifenil)acetilamino]benzoico, (1.21)

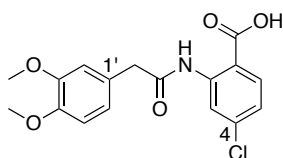
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (169 mg, 0.98 mmol) y el ácido 2,4-dimetoxifenilacético (161 mg, 0.90 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método A. El producto **1.21** se aísla por un proceso de trituración con metanol como solvente. Sólido amorfo blanco (141 mg). Rdto. 45%.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.71 (s, 2H, CH₂CO), 3.73 (s, 6H, CH₃O), 6.41 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{3'}), 6.53 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{5',6'}), 7.19 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₅), 8.64 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.22 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 44.9 (CH₂CO), 55.1 (CH₃O), 99.1 (C_{3'}), 107.6 (C_{5',6'}), 114.9 (C₁), 119.0 (C₃), 122.6 (C₅), 132.8 (C₆), 136.4 (C_{1'}), 138.4 (C₄), 141.8 (C₂), 160.5 (C_{2',4'}), 168.6 (CH₂CO), 169.8 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 2.94 min. **LC-MS**: 350.4 ([M+H]⁺). **HRMS** (EI⁺) *m/z* encontrada 349.0726 ([M]⁺ C₁₇H₁₆NO₅Cl calculada 349.0717).

Ácido 4-cloro-2-[2-(3,4-dimetoxifenil)acetilamino]benzoico, (1.22)

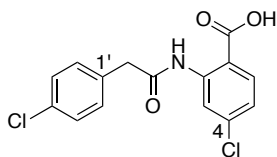
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (178 mg, 1.04 mmol) y el ácido 3,4-dimetoxifenilacético (184 mg, 0.94 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método A. El producto **1.22** se aísla por un proceso de tritución con metanol como solvente. Sólido amorfo blanco (77.6 mg). Rdto. 23%.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.70 (s, 2H, CH₂CO), 3.73 (s, 3H, CH₃O), 3.75 (s, 3H, CH₃O), 6.86 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H₆), 6.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₅), 6.97 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₂), 7.19 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 8.66 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.19 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 44.3 (CH₂CO), 55.4 (CH₃O), 55.4 (CH₃O), 111.9, 113.4, 114.8 (C₁), 119.0 (C₃), 121.7, 122.6 (C₅), 126.5, 132.9 (C₆), 138.5 (C₄), 141.9 (C₂), 147.9 (C_{4'}), 148.7 (C_{3'}), 168.7 (CO₂H), 170.5 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 2.31 min. **LC-MS**: 350.3 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 349.0724 ([M]⁺ C₁₇H₁₆NO₅Cl calculada 349.0717).

Ácido 4-cloro-2-[2-(4-clorofenil)acetilamino]benzoico, (1.24)

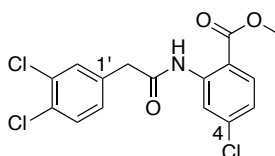
Sobre una disolución del cloruro de ácido 4-cloro-fenilacético (134 μL, 0.91 mmol) en 2 mL de THF anhidro, se adiciona el ácido 2-amino-4-clorobenzoico (157 mg, 0.91 mmol) óxido de propileno (0.91 mL, 13.65 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. El disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se extrae con AcOEt (3x15 mL) y se lava con disolución saturada de NaCl (3x15 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra a vacío. El residuo obtenido se aísla por un proceso de tritución con éter como solvente, obteniéndose 248.4 mg (Rdto. 84%) del producto deseado como un sólido amorfo blanco.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.81 (s, 2H, CH₂CO), 7.20 (ddd, *J* = 8.6, 2.2, 0.9 Hz, 1H, H₅), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.94 (dd, *J* = 8.6, 0.9 Hz, 1H, H₆), 8.61 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H₃), 11.20 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43.6 (CH₂CO), 115.1 (C₁), 119.2 (C₃), 122.8 (C₅), 128.6 (C_{2',6'}), 131.7 (C_{3',5'}), 131.9 (C_{4'}), 132.9 (C₆), 133.5 (C_{1'}), 138.5 (C₄), 141.8 (C₂), 168.8 (CO₂H), 169.8 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 5.75 min. **LC-MS**: 324.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 323.0119 ([M]⁺ C₁₅H₁₁NO₃Cl₂ calculada 323.0116).

4-cloro-2-[2-(3,4-diclorofenil)-acetilamino]-benzoato de metilo, (1.26)

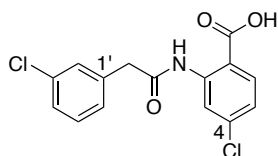
Preparado a partir de 2-amino-4-clorobenzoato de metilo (639 mg, 3.44 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (1.0 g, 5.16 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.26** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (827.9 mg). Rdto. 64%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.81 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.84 (s, 2H, CH₂CO), 7.27 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.35 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.65 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 7.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 8.35 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 10.72 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.4 (CH₂CO), 52.6 (CO₂CH₃), 116.4 (C₁), 120.5 (C₃), 123.4 (C₅), 129.7 (C_{4'}), 130.0 (C_{6'}), 130.5 (C_{5'}), 130.9 (C_{3'}), 131.7 (C_{2'}), 132.3 (C₆), 135.9 (C_{1'}), 138.3 (C₄), 140.4 (C₂), 166.7 (CH₂CO), 169.1 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 2.68 min. **LC-MS**: 372.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 370.9887 ([M]⁺ C₁₆H₁₂NO₃Cl₃ calculada 370.9883).

Ácido 3-cloro-2-[2-(3-clorofenil)acetilamino]benzoico, (1.32)

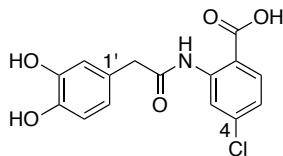
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (111 mg, 0.64 mmol) y el ácido 3-clorofenilacético (165 mg, 0.97 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.32** se aísla por un proceso de trituración con una mezcla 1:1 de CH₃CN:MeOH como solvente. Sólido amorfo blanco (167.1 mg). Rdto. 54%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3.83 (s, 2H, CH_2CO), 7.21 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, H_5), 7.29-7.41 (m, 3H, $\text{H}_{4',5',6'}$), 7.45 (s, 1H, H_2), 7.95 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_6), 8.60 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_3), 11.23 (s, 1H, NH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 43.7 (CH_2CO), 115.2 (C_1), 119.2 (C_3), 122.8 (C_5), 127.1 (C_4'), 128.5 (C_6'), 129.7 (C_2'), 130.4 (C_5'), 132.9 (C_6), 133.1 (C_3'), 136.9 (C_1'), 138.5 (C_4), 141.7 (C_2), 168.7 (CO_2H), 169.6 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 4.11$ min. **LC-MS**: 324.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (EI^+) m/z encontrada 323.01069 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 323.0116).

Ácido 4-cloro-2-[2-(3,4-dihidroxifenil)acetilamino]benzoico, (1.33)

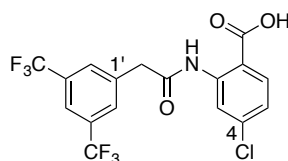
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (159 mg, 0.93 mmol) y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (203 mg, 1.21 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 80% de CH_3CN en H_2O . Sólido amorfo blanco (156.5 mg). Rdto. 52%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3.56 (s, 2H, CH_2CO), 6.59 (dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1H, H_6'), 6.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_5'), 6.71 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H_2'), 7.19 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H, H_5), 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_6), 8.67 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_3), 8.85 (s, 1H, OH), 8.92 (s, 1H, OH), 11.36 (s, 1H, NH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 44.3 (CH_2CO), 115.8 (C_1), 116.8 (C_2'), 118.8 (C_5'), 120.5 (C_3), 122.5 (C_6'), 125.0 (C_5), 132.9 ($\text{C}_{6,1'}$), 138.3 (C_4), 142.0 (C_2), 144.5 (C_4'), 145.3 (C_3'), 168.8 (CO_2H), 170.8 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): $t_R = 3.97$ min. **LC-MS**: 322.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (EI^+) m/z encontrada 321.0393 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_5\text{Cl}$ calculada 321.0404).

Ácido 4-cloro-2-[2-((3,5-bis(trifluorometil))fenil)acetilamino]benzoico, (1.34)

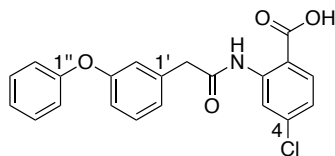
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (84 mg, 0.49 mmol) y el ácido 2-(3,5-bis(trifluorometil))fenilacético (200 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.34** se aísla por un proceso de trituración con CH₃CN como solvente. Sólido amorfo blanco (157.8 mg). Rdto. 76%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4.12 (s, 2H, CH₂CO), 7.23 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₆), 7.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₅), 8.03 (s, 1H, H_{4'}), 8.11 (s, 2H, H_{2',6'}), 8.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.26 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.6 (CH₂CO), 115.4 (C₁), 119.4, 120.6-120.9 (m, C_{4'}), 122.9, 123.4 (c, *J* = 272.8 Hz, CF₃), 130.1 (c, *J* = 32.7 Hz, C_{3',5'}), 130.9-131.1 (m, C_{2',6'}), 132.8 (C₆), 138.0 (C_{1'}), 138.4 (C₄), 141.5 (C₂), 168.6 (CO₂H), 168.9 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 6.24 min. **LC-MS**: 426.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 425.02651 ([M]⁺ C₁₇H₁₀NO₃F₆Cl calculada 425.02534).

Ácido 4-cloro-2-[2-(3-fenoxifenil)acetilamino]benzoico, (1.35)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (83 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3-fenoxifenilacético (166 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente**: gradiente de 0 a 40% de AcOEt (1% de ácido acético) en hexano. Sólido amorfo blanco (102 mg). Rdto. 54%.

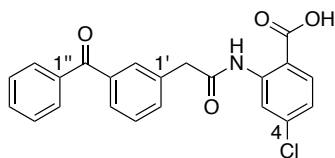


¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.80 (s, 2H, CH₂CO), 6.93 (ddd, *J* = 8.2, 2.5, 0.9 Hz, 1H, H_{4'}), 6.98-7.06 (m, 3H, H_{2',2'',6''}), 7.07-7.17 (m, 2H, H_{6',4''}), 7.21 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.32-7.42 (m, 3H, H_{5',3'',5''}), 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 8.63 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.21 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 44.5 (CH₂CO), 115.3 (C₁), 117.9 (C_{4'}), 118.9 (C_{2',6''}), 119.4 (C₃), 120.4 (C_{2'}), 123.0 (C₅), 123.7 (C_{4''}), 125.3 (C_{6'}),

130.4 (C_{3'',5''}), 130.6 (C_{5'}), 133.2 (C₆), 136.8 (C_{1'}), 138.8 (C₄), 142.1 (C₂), 157.1 (C_{3',1''}), 169.0 (CO₂H), 170.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 60-95% de A en B, 5 min): t_R = 3.82 min. **LC-MS**: 382.5 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 381.0778 ([M]⁺ C₂₁H₁₆NO₄Cl calculada 381.0768). **Análisis elemental** calculado para C₂₁H₁₆NO₄Cl (%): C: 66.06, H: 4.22, N: 3.67. Encontrado (%): C: 66.27, H: 4.20, N: 3.69.

Ácido 4-cloro-2-[2-(3-benzoilfenil)acetilamino]benzoico, (1.36)

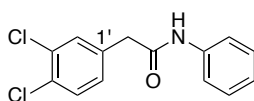
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (83 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3-benzoilfenilacético (175 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 45% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (77 mg). Rdto. 40%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.93 (s, 2H, CH₂CO), 7.22 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.51-7.59 (m, 3H, H_{5',3'',5''}), 7.64-7.70 (m, 3H, H_{4',6',4''}), 7.74 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H_{2'}), 7.75 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H, H_{2'',6''}), 7.96 (dd, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 8.62 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.24 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43.9 (CH₂CO), 115.1 (C₁), 119.2 (C₃), 122.7 (C₅), 128.5 (C_{4'}), 128.6 (C_{3'',5''}), 128.9 (C_{5'}), 129.7 (C_{2'',6''}), 130.9 (C_{6'}), 132.8 (C₆), 132.9 (C_{4''}), 134.1 (C_{2'}), 135.0 (C_{1'}), 137.0 (C_{3'}), 137.3 (C_{1''}), 138.5 (C₄), 141.7 (C₂), 168.7 (CO₂H), 169.8 (CH₂CO), 195.7 (PhCOPh). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 4.95 min. **LC-MS**: 394.3 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 393.07623 ([M]⁺ C₂₂H₁₆NO₄Cl calculada 393.07679).

2-(3,4-diclorofenil)-N-fenilacetamida, (1.42)

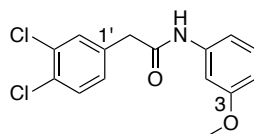
Preparado a partir de la anilina (81 μL, 0.88 mmol) y el cloruro del ácido 3,4-diclorofenilacético (154 mg, 0.80 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método A. Purificación por cromatografía. **Eluyente**: gradiente de 0 a 50% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (118.8 mg). Rdto. 53%.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.69 (s, 2H, CH₂CO), 7.04 (tt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H₄), 7.23-7.36 (m, 3H, H_{3,5,2'}), 7.51-7.71 (m, 4H, H_{2,6,5',3'}), 10.17 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.9 (CH₂CO), 119.1, 123.3 (C₄), 128.7, 129.2 (C_{4'}), 129.7, 130.3, 130.7 (C_{3'}), 131.3, 137.0 (C_{1'}), 139.0 (C₁), 168.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 3.39 min. **LC-MS**: 280.4 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 279.0218 ([M]⁺ C₁₄H₁₁NOCl₂ calculada 279.0218).

2-(3,4-diclorofenil)-N-(3-metoxifenil)acetamida, (1.43)

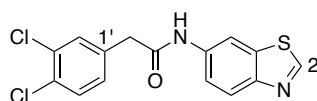
Preparado a partir de la 3-metoxianilina (99 μL, 0.88 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (164 mg, 0.80 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método A. El producto **1.43** se aísla por un proceso de trituración con metanol como solvente. Sólido amorfo blanco (95 mg). Rdto. 38%.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.68 (s, 2H, CH₂CO), 3.79 (s, 3H, CH₃O), 6.62 (ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.0 Hz, 1H, H₄), 7.10 (ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.0 Hz, 1H, H₆), 7.20 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₅), 7.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₂), 7.31 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 10.17 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.9 (CH₂CO), 54.9 (CH₃O), 104.8 (C₂), 108.8 (C₄), 111.4 (C₆), 129.3 (C_{4'}), 129.5 (C_{6'}), 129.7 (C_{5'}), 130.3 (C_{2'}), 130.7 (C_{3'}), 131.3 (C₅), 136.9 (C_{1'}), 140.2 (C₁), 159.5 (C₃), 168.3 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 3.33 min. **LC-MS**: 310.4 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 309.0336 ([M]⁺ C₁₅H₁₃NO₂Cl₂ calculada 309.0323).

N-(benzotiazol-6-il)-2-(3,4-diclorofenil)acetamida, (1.44)

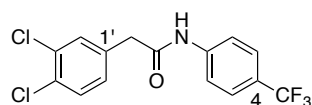
Preparado a partir de 6-aminobenzotiazol (92 mg, 0.61 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (155 mg, 0.92 mmol) siguiendo el procedimiento general 3.4, método C. El producto **1.44** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente seguida de un lavado con CH₃CN. Sólido amorfo blanco (136.8 mg). Rdto. 66%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.74 (s, 2H, CH₂CO), 7.34 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, H_{6'}), 7.57 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.61 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{2'}), 8.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₄), 8.52 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₂), 10.50 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.9 (CH₂CO), 111.8 (C₅), 118.8, 123.1, 129.4 (C_{4'}), 129.8 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 130.8 (C_{3'}), 131.4 (C_{2'}), 134.3 (C₄), 136.8 (C_{1'}), 136.9 (C₆), 149.2 (C_{3a}), 154.9 (C₂), 168.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 15-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 4.88 min. **LC-MS**: 337.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 335.9877 ([M]⁺ C₁₅H₁₀N₂OCl₂S calculada 335.9891).

2-(3,4-diclorofenil)-N-[4-(trifluorometil)fenil]acetamida, PC252 (1.45)

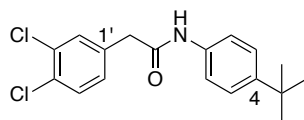
Preparado a partir de 4-trifluorometilfenilalanilina (98 μL, 0.78 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (198 mg, 1.17 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.45** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (248.3 mg). Rdto. 91%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.74 (s, 2H, CH₂CO), 7.32 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.61 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{3,5}), 7.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{2,6}), 10.56 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.9 (CH₂CO), 118.9-119.1 (m, C_{2,6}), 123.4 (c, *J* = 32.1 Hz, C₄), 124.4 (c, *J* = 221.4 Hz, CF₃), 126.7-126.9 (m, C_{3,5}), 129.4 (C_{4'}), 129.9 (C₆), 130.4 (C_{5'}), 130.7 (C_{3'}), 131.4 (C_{2'}), 136.6 (C_{1'}), 142.6 (C₁), 169.0 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 30-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 7.49 min. **LC-MS**: 348.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 347.0078 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NOCl₂F₃ calculada 347.0092).

2-(3,4-diclorofenil)-N-(4-terbutilfenil)acetamida, (1.46)

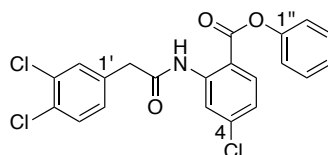
Preparado a partir de 4-terbutilalanilina (109 μL, 0.68 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (202 mg, 1.02 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.46** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (177 mg). Rdto. 56%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.24 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 3.67 (s, 2H, CH_2CO), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{3,5}$), 7.31 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{6'}$), 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{2,6}$), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.59 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H_2), 10.14 (s, 1H, NH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 31.2 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 34.0 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 41.9 (CH_2CO), 119.0 ($\text{C}_{2,6}$), 125.4 ($\text{C}_{3,5}$), 129.3 ($\text{C}_{4'}$), 129.7 ($\text{C}_{6'}$), 130.4 ($\text{C}_{5'}$), 130.7 ($\text{C}_{3'}$), 131.3 ($\text{C}_{2'}$), 136.5 ($\text{C}_{1'}$), 137.2 (C_1), 145.7 (C_4), 168.0 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 30-95% de A en B, 10 min): $t_R = 8.60$ min. **LC-MS**: 336.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS (EI $^+$)** m/z 335.08434 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NOCl}_2$ calculada 335.08437).

Ácido 4-cloro-2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]benzoato de fenilo, (1.48)

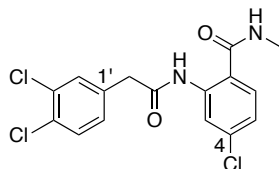
Preparado a partir del 2-amino-4-clorobenzoato de fenilo (255 mg, 1.29 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (370 mg, 1.94 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 20% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (173.1 mg). Rdto. 35%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3.43 (s, 2H, CH_2CO), 7.04 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, H_5), 7.29 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{4''}$), 7.33 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H_3), 7.39 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{6'}$), 7.43 (td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{3'',5''}$), 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_6), 7.57-7.63 (d, 4H, $\text{H}_{2'',6'',2',5'}$), 10.26 (s, 1H, NH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 41.2 (CH_2CO), 123.9 (C_1), 124.6 (C_3), 128.2 ($\text{C}_{3'',5''}$), 129.3 ($\text{C}_{1''}$), 129.4 ($\text{C}_{2'',4''}$), 129.6, 129.9, 130.3, 130.7, 131.2 ($\text{C}_{4'}$), 131.3, 131.7 ($\text{C}_{3'}$), 132.6, 135.8, 136.3, 136.9, 137.6, 168.9 (CH_2CO), 195.6 (CO_2Ph). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): $t_R = 4.19$ min. **LC-MS**: 384.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

4-cloro-2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-N-metilbenzamida, (1.49)

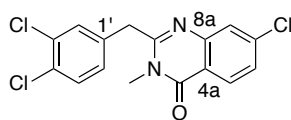
Sobre una disolución del intermedio **1.6** (100 mg, 0.30 mmol) en 0,5 mL de DMF anhidra, se añade NMM (34 μ L, 0.31 mmol), HOBT (4 mg, 0.31 mmol), PyBOP (160 mg, 0.31 mmol). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de argón durante 1 h. A continuación, se adicionan 50 μ L (1.40 mmol) de una disolución 2.0 M de metilamina en THF y se agita a temperatura ambiente 12 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo se resuspende sobre 30 mL AcOEt y se extrae con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 10% (3x30 mL). La fase orgánica se lava con una solución saturada de NaCl (30 mL), se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash utilizando un gradiente de 0 a 50% de AcOEt en hexano, obteniéndose 104 mg (Rdto. 23%) del producto deseado como un sólido amorfo blanco.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.76 (d, 3H, J = 4.5 Hz, CONHCH₃), 3.80 (s, 2H, CH₂CO), 7.23 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.33 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.60 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.63 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H₂), 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H₆), 7.45 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H₃), 8.76 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CONHCH₃), 11.51 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 26.9 (CONHCH₃), 43.2 (CH₂CO), 120.3 (C₁), 120.4 (C₃), 123.6 (C₅), 130.3 (C_{4',6'}), 130.7 (C_{5'}), 131.1 (C_{2'}), 131.5 (C_{3'}), 132.4 (C₆), 136.7 (C₄), 136.7 (C_{1'}), 140.5 (C₂), 168.2 (CONHCH₃), 169.5 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 60-95% de A en B, 5 min): t_R = 2.96 min. **LC-MS**: 371.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 370.0028 ([M]⁺ C₁₆H₁₃N₂O₂Cl₃ calculada 370.0043).

7-cloro-[2-(3,4-diclorobencil)-3-metil-4(3H)]quinazolinona, (1.50)

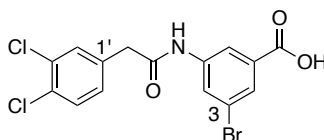
Preparado a partir del intermedio **1.6** (100 mg, 0.28 mmol) y la metilamina (50 μ L, 1.39 mmol) como subproducto de reacción siguiendo el procedimiento descrito para PC259A. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 50% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (99 mg). Rdto. 14%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.49 (s, 3H, CH₃NCO_{cic}), 4.31 (s, 2H, CH₂CN), 7.30 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.53 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, H₆), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.62 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, H_{2',8}), 8.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₅). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 30.5 (CH₃NCO_{cic}), 33.7 (CH₂CN), 118.7 (C_{4a}), 126.0 (C₈), 126.9 (C₆), 128.4 (C₅), 129.5 (C_{4'}), 129.7 (C_{6'}), 130.6 (C_{5'}), 131.0 (C_{3'}), 131.3 (C_{2'}), 136.8 (C_{1'}), 138.9 (C₇), 147.8 (C_{8a}), 157.4, 160.9 (CH₃NCO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 60-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 3.84 min. **LC-MS**: 353.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 351.9945 ([M]⁺ C₁₆H₁₁N₂OCl₃ calculada 351.9937).

Ácido 3-bromo-5-[2-(3,5-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.53)

Preparado a partir del ácido 3-amino-5-bromobenzoico (105 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3,5-diclorofenilacético (150 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.53** se aísla por un proceso de trituración con CH₃CN como solvente seguido de un lavado con MeOH. Sólido amorfo blanco (100.4 mg). Rdto. 35%.

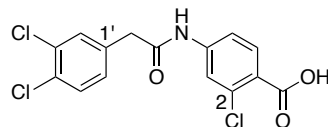


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.71 (s, 2H, CH₂CO), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.63 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H, H_{2,6}), 8.04 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₄), 10.46 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.8 (CH₂CO), 121.0, 122.8, 129.4 (C₁), 129.4 (C_{4'}), 129.9 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 130.7 (C_{3'}), 131.4 (C_{2'}), 133.6, 134.2, 136.6 (C_{1'}), 138.4 (C₅), 167.0 (CO₂H), 168.7 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 3.71 min. **LC-MS**: 401.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 400.92026 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₂Br calculada 400.92211).

Ácido 2-cloro-4-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.54)

Preparado a partir del ácido 4-amino-2-clorobenzoico (84 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3,5-diclorofenilacético (150 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general

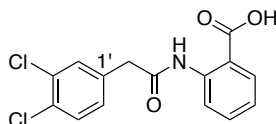
2.1.3, método C. El producto **1.54** se aísla por un proceso de trituración con una mezcla 1:1 de CH₃CN:MeOH como solvente. Sólido amorfo blanco (149.6 mg). Rdto. 85%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.74 (s, 2H, CH₂CO), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.53 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H₅), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 7.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 7.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₃), 10.59 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.8 (CH₂CO), 117.0 (C₅), 120.2 (C₃), 124.6 (C₁), 129.4 (C_{4'}), 129.9 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 130.7 (C_{3'}), 131.5 (C₂), 132.5 (C₆), 133.1 (C₂), 136.4 (C_{1'}), 142.6 (C₄), 165.9 (CO₂H), 169.1 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 2.72 min. **LC-MS**: 358.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 356.97283 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₃ calculada 356.97263).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (**1.59**)

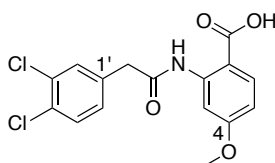
Preparado a partir del ácido 2-aminobenzoico (245 mg, 1.78 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (310 mg, 1.62 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método A. El producto **1.59** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (135.7 mg). Rdto. 26%.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.83 (s, 2H, CH₂CO), 7.14 (td, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H, H₅), 7.36 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.56 (td, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, H₄), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.95 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, H₆), 8.46 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H, H₃), 11.09 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.9 (CH₂CO), 116.7 (C₁), 120.0 (C₃), 122.9 (C₅), 129.7 (C_{4'}), 130.2 (C_{6'}), 130.6 (C_{5'}), 130.9 (C_{3'}), 131.1 (C_{2'}), 131.8 (C₆), 134.0 (C_{1'}), 136.0 (C₄), 140.6 (C₂), 168.7 (CH₂CO), 169.4 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): t_R = 3.22 min. **LC-MS**: 324.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 323.0118 ([M]⁺ C₁₅H₁₁NO₃Cl₂ calculada 323.0116).

Ácido 4-metoxi-2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.60)

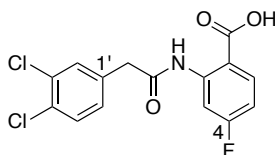
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-metoxibenzoico (169 mg, 1.01 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (175 mg, 0.92 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método A. El producto **1.60** se aísla por un proceso de trituración con metanol como solvente. Sólido amorfo blanco (39.9 mg). Rdto. 12%.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.79 (s, 3H, CH₃O), 3.84 (s, 2H, CH₂CO), 6.71 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H, H₅), 7.36 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.66 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 7.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H₆), 8.19 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H₃), 11.35 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43.0 (CH₂CO), 55.4 (CH₃O), 104.4 (C₃), 108.4 (C₁), 108.6 (C₅), 129.7 (C_{4'}), 130.2 (C_{6'}), 130.5 (C_{5'}), 130.9 (C_{3'}), 131.8 (C_{2'}), 133.0 (C₆), 135.8 (C_{1'}), 142.7 (C₂), 163.5 (C₄), 168.9 (CO₂H), 169.3 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 15-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 3.35 min. **LC-MS**: 354.4 ([M+H]⁺). **HRMS** (EI⁺) *m/z* encontrada 353.0218 ([M]⁺ C₁₆H₁₃NO₄Cl₂ calculada 353.0222).

Ácido 2-[2-(3,5-diclorofenil)acetilamino]-4-fluorobenzoico, (1.61)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-fluorobenzoico (76 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (150 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.61** se aísla por un proceso de trituración con una mezcla 1:1 de CH₃CN:MeOH como solvente seguido de un lavado con AcOEt. Sólido amorfo beige (72.1 mg). Rdto. 43%.

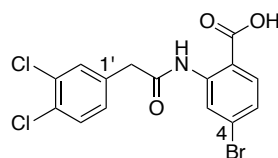


¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.87 (s, 2H, CH₂CO), 6.99 (ddd, *J* = 8.9, 7.9, 2.7 Hz, 1H, H₅), 7.36 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 8.03 (dd, *J* = 8.9, 6.8 Hz, 1H, H₆), 8.36 (d, *J* = 12.3, 2.7 Hz, 1H, H₃), 11.30 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.9 (CH₂CO), 106.3 (d, *J* =

28.3 Hz, C₅), 109.9 (d, *J* = 22.1 Hz, C₃), 112.7 (d, *J* = 2.6 Hz, C₁), 129.8 (C_{4'}), 130.3 (C_{6'}), 130.6 (C_{5'}), 131.0 (C_{3'}), 131.9 (C_{2'}), 133.9 (d, *J* = 11.0 Hz, C₆), 135.5 (C_{1'}), 142.8 (d, *J* = 12.9 Hz, C₂), 164.9 (d, *J* = 249.4 Hz, C₄), 168.7 (CO₂H), 169.3 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t_R* = 4.36 min. **LC-MS**: 342.1 ([M+H]⁺). **HRMS** (EI⁺) *m/z* encontrada 341.00064 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₂F calculada 341.00218).

Ácido 4-bromo-2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.62)

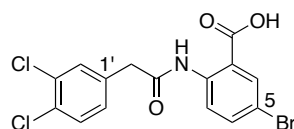
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-bromobenzoico (146 mg, 0.68 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (208 mg, 1.01 mmol) siguiendo el procedimiento general 3.4, método C. El producto **1.62** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (182.3 mg). Rdto. 69%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.85 (s, 2H, CH₂CO), 7.36 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H, H_{5,6'}), 7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.62 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₂), 7.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₆), 8.74 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₃), 11.15 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.8 (CH₂CO), 115.6 (C₁), 122.2 (C₃), 125.8 (C₅), 127.5 (C₆), 129.8 (C_{4'}), 130.3 (C_{6'}), 130.6 (C_{5'}), 131.0 (C_{3'}), 131.9 (C_{2'}), 132.8 (C₄), 135.6 (C_{1'}), 141.6 (C₂), 168.8 (CO₂H), 169.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t_R* = 4.34 min. **LC-MS**: 402.0 ([M+H]⁺). **HRMS** (EI⁺) *m/z* encontrada 400.9208 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₂Br calculada 400.9221).

Ácido 5-bromo-2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.67)

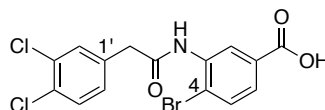
Preparado a partir del ácido 2-amino-5-bromobenzoico (127 mg, 0.60 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (181 mg, 0.88 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.67** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (222.5 mg). Rdto. 94%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.83 (s, 2H, CH₂CO), 7.35 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H, H_{6'}), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.65 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H_{2'}), 7.76 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H, H_{4'}), 8.01 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H₆), 8.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H₃), 11.01 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.8 (CH₂CO), 114.4 (C₁), 119.0 (C₃), 122.3 (C₅), 129.7 (C_{4'}), 130.3 (C_{6'}), 130.6 (C_{5'}), 131.0 (C_{3'}), 131.9 (C_{2'}), 133.1 (C₄), 135.8 (C₆), 136.5 (C_{1'}), 139.6 (C₂), 168.0 (CO₂H), 168.9 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 30-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 7.71 min. **LC-MS**: 403.9 (M+H)⁺. **LC-MS**: 401.9 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 400.9236 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₂Br calculada 400.9221).

Ácido 4-bromo-3-[2-(3,5-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.68)

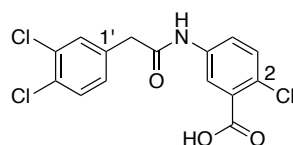
Preparado a partir del ácido 3-amino-4-bromobenzoico (105 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3,5-diclorofenilacético (150 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.68** se aísla por un proceso de trituración con una mezcla 1:1 de CH₃CN:MeOH como solvente. Sólido amorfo blanco (190 mg). Rdto. 96%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.79 (s, 2H, CH₂CO), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H_{6'}), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.65 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H₆), 7.66 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{2'}), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅), 8.13 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₂), 9.87 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.2 (CH₂CO), 127.4 (C₁), 129.4 (C_{4'}), 129.8 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 130.7 (C_{3'}), 131.4 (C_{2'}), 133.5, 133.1, 136.3, 136.8, 166.4 (CO₂H), 168.8 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 2.88 min. **LC-MS**: 402.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 400.92131 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₂Br calculada 400.92211).

Ácido 2-cloro-5-[2-(3,5-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.69)

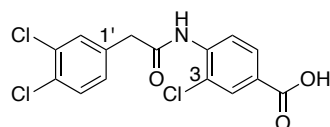
Preparado a partir del ácido 5-amino-2-clorobenzoico (84 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3,5-diclorofenilacético (150 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.69** se aísla por un proceso de trituración con MeOH como solvente seguido de un lavado con AcOEt. Sólido amorfo blanco (126.9 mg). Rdto. 72%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.71 (s, 2H, CH₂CO), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.47 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₃), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 7.72 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H, H₄), 8.08 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H₆), 10.46 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.8 (CH₂CO), 121.1 (C₄), 122.8 (C₆), 125.5 (C₁), 129.4 (C_{4'}), 129.8 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 130.7 (C_{3'}), 131.1 (C₃), 131.3 (C₂), 131.4 (C_{2'}), 136.6 (C_{1'}), 137.9 (C₅), 166.4 (CO₂H), 168.7 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 2.66 min. **LC-MS**: 358.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 356.97247 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₃ calculada 356.97263).

Ácido 3-cloro-4-[2-(3,5-diclorofenil)acetilamino]benzoico, (1.70)

Preparado a partir del ácido 4-amino-3-clorobenzoico (84 mg, 0.49 mmol) y el ácido 3,5-diclorofenilacético (150 mg, 0.73 mmol) siguiendo el procedimiento general 3.4, método C. El producto **1.70** se aísla por un proceso de trituración con CH₃CN como solvente seguido de un lavado con MeOH. Sólido amorfo blanco (60.3 mg). Rdto. 34%.

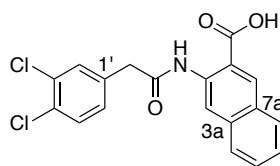


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.85 (s, 2H, CH₂CO), 7.35 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.86 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H, H₆), 7.96 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₂), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅), 9.91 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41.4 (CH₂CO), 124.6 (C₅), 125.1 (C₁), 128.0 (C₃), 128.5, 129.4 (C_{4'}), 129.8 (C_{6'}), 130.2, 130.4 (C_{5'}), 130.7 (C_{3'}), 131.4 (C_{2'}), 136.6 (C_{1'}), 138.7 (C₄), 165.8 (CO₂H), 169.1 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 3.00 min. **LC-MS**: 358.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 356.9724 ([M]⁺ C₁₅H₁₀NO₃Cl₃ calculada 356.97263).

Ácido 3-[2-(3,4diclorofenil)acetilamino]-2-naftoico, (1.72)

Preparado a partir del ácido 2-aminonaftoico (196 mg, 1.05 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (310 mg, 1.57 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3,

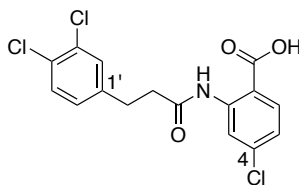
método C. El producto **1.72** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (275 mg). Rdto. 70%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.87 (s, 2H, CH₂CO), 7.39 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.47 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, H₆), 7.60 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, H₅), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.70 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 7.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₇), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₄), 8.66 (s, 1H, H₈), 8.90 (s, 1H, H₃), 11.14 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 42.9 (CH₂CO), 116.9 (C₃), 117.7 (C₁), 125.6, 127.1, 128.3, 129.1, 129.2, 129.7 (C_{4'}), 130.3 (C_{6''}), 130.6 (C_{5'}), 130.9 (C_{3'}), 131.9 (C_{2'}), 133.0 (C_{7a}), 135.5 (C_{3a}), 135.8 (C_{1'}), 136.1 (C₂), 168.6 (CO₂H), 169.4 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): t_R = 4.05 min. **LC-MS**: 374.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 373.0278 ([M]⁺ C₁₉H₁₃NO₃Cl₂ calculada 373.0272).

Ácido 4-cloro-2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]benzoico, (1.73)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (89 mg, 0.52 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (147 mg, 0.67 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.73** se aísla por un proceso de trituración con MeOH como solvente seguido de un lavado con CH₃CN. Sólido amorfo blanco (125 mg). Rdto: 72%.

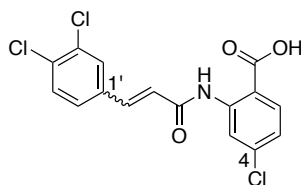


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 7.21 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 7.27 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.57 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}), 7.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 8.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.23 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29.3 (CH₂CH₂CO), 38.1 (CH₂CH₂CO), 115.1 (C₁), 119.2 (C₃), 122.6 (C₅), 128.7 (C_{4'}), 128.9 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 130.5 (C_{2'}), 130.8 (C_{3'}), 132.9 (C₆), 138.5 (C₄), 141.7 (C_{1'}), 142.0 (C₂), 168.8 (CO₂H), 170.7 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 60-95% de A en B, 5 min): t_R = 4.05 min. **LC-MS**: 374.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 373.0278 ([M]⁺ C₁₉H₁₃NO₃Cl₂ calculada 373.0272).

B, 5 min): t_R = 3.72 min. **LC-MS (m/z)**: 372.1 ($[M+H]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 370.9892 ($[M]^+$ C₁₆H₁₂NO₃Cl₃ calculada 370.9883).

Ácido (Z,E)-4-cloro-2-[3-(3,4-diclorofenil)acrilamido]benzoico, (1.74)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (96 mg, 0.56 mmol) y el ácido 3,4-diclorocinámico (183 mg, 0.84 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3 método C. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 50% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo beige (25.1 mg). Rdto. 12%.

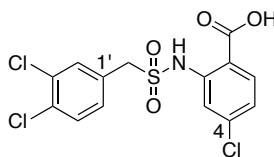


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.06 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CHCH_{trans}), 7.19 (m, 2H, H_{5,6'-cis}), 7.25 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H_{5-trans}), 7.42 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CHCH_{cis}), 7.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H_{2'-cis}), 7.61 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CHCH_{trans}), 7.68 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CHCH_{trans}), 7.68 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{5'-trans}), 7.75 (dd, J = 8.4, 1.9 Hz, 1H, H_{6'-trans}), 7.93 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H_{6-cis}), 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H_{6-trans}), 8.12 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H_{2'-trans}), 8.47 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H_{3-cis}), 8.74 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H_{3-trans}), 11.40 (s, 1H, NH_{cis}), 11.59 (s, 1H, NH_{trans}). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 115.6 (C_{1-trans}), 115.6 (C_{1-cis}), 119.5 (C_{3-trans}), 119.5 (C_{3-cis}), 122.8 (C_{5-trans}), 122.8 (C_{5-cis}), 124.3, 128.5, 130.0, 130.2, 130.7, 131.0, 131.8, 132.4, 135.3, 138.3, 139.5, 139.8, 141.5 (C_{2-cis}), 141.9 (C_{2-trans}), 163.8 (CHCO_{trans}), 168.6 (CHCO_{cis}), 166.8 (CO₂H_{trans}), 163.8 (CO₂H_{cis}). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 60-95% de A en B, 5 min): t_R = 4.76 min. **LC-MS**: 372.2 ($[M+H]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 368.97282 ($[M]^+$ C₁₆H₁₀NO₃Cl₃ calculada 368.97263).

Ácido 4-cloro-2-(((3,4-diclorofenil)metil)sulfonamido]benzoico, (1.75)

Sobre una solución de **1.80** (30 mg, 0.07 mmol) en 1 ml de THF, se adicionan 148 μ L de una disolución de NaOH 2N. La mezcla de reacción se agita a 50°C durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida. El sólido resultante se resuspende en agua, se acidifica con HCl 1N a pH 3 o 4 y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3x10 mL). Los extractos orgánicos se lavan con una disolución saturada de NaCl (30 mL), se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a sequedad.

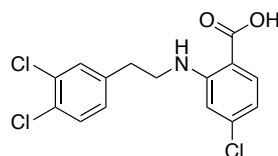
El crudo se trata con CH₃CN y el precipitado se lava con 1 mL de CH₃CN, obteniéndose 27 mg (Rdto. 92%) del producto deseado como un sólido amorfo blanco.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4.87 (s, 2H, CH₂SO₂), 7.17 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H, H₅), 7.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₃), 7.30 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.47 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₆), 11.14 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 56.9 (CH₂SO₂), 114.2 (C₁), 116.7 (C₃), 122.4 (C₅), 129.9 (C_{6'}), 130.6 (C_{5'}), 131.0 (C_{4'}), 131.3 (C_{2'}), 131.6 (C_{3'}), 132.8 (C₆), 133.1 (C_{1'}), 138.9 (C₄), 142.1 (C₂), 169.1 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 70-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 1.65 min. **LC-MS**: 417.0 ([M+Na]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 392.93967 ([M]⁺ C₁₄H₁₀NO₄Cl₃S calculada 392.93961).

Ácido 4-cloro-2-[(3,4-diclorofenetil)amino]benzoico, (1.76)

Sobre una solución de **1.82** (23 mg, 0.06 mmol) en 1.2 mL de THF y 0.6 mL de MeOH, se adicionan 0.2 mL de una disolución de NaOH 2N. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida. El sólido resultante se resuspende en agua (10 mL), se acidifica con HCl 1N a pH 5 o 6 y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3x10 mL). Los extractos orgánicos se lavan con agua y una disolución saturada de NaCl (30 mL), se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a sequedad. El crudo se purifica por cromatografía en columna empleando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose 15.7 mg (Rdto. 76%) del producto deseado como un sólido amorfo amarillento.

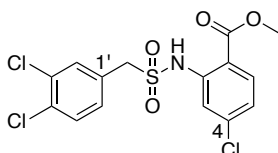


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 3.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 6.57 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, H₅), 6.82 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₃), 7.29 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.55 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H,

H₂'), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₆), 7.94-8.06 (bs, NH), 12.68-12.99 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 33.5 (CH₂CH₂NH), 42.8 (CH₂CH₂NH), 109.5 (C₁), 110.6 (C₃), 114.2 (C₅), 128.8 (C₄'), 129.3, 130.3, 130.9, 133.4, 139.3 (C₄), 140.5, 151.4, 169.3 (C₂), 173.4 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 4.69 min. **LC-MS**: 344.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 342.99502 ([M]⁺ C₁₅H₁₂NO₂Cl₃ calculada 342.99336).

4-cloro-2-[(3,4-diclorofenil)metil]sulfonamido]benzoato de metilo, (1.80)

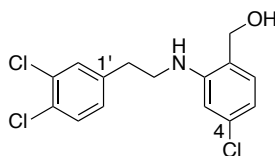
Sobre una disolución de 2-amino-4-clorobenzoato de metilo (63 mg, 0.34 mmol) y NMM (41 µL, 0.48 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ anhidro a 10°C, se adiciona gota a gota una solución de cloruro de 3,4-diclorobenzilsulfonilo (115 mg, 0.44 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ anhidro. La mezcla de reacción se agita a 30°C durante 48 h. Cuando se alcanza la temperatura ambiente, se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se resuspende en CH₂Cl₂ (10 mL) y se extrae con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 10% (3x10 mL). La fase orgánica se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl (30 mL), se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash utilizando un gradiente de 0 a 25% de AcOEt en hexano, obteniéndose 91 mg (Rdto. 65%) del producto deseado como un sólido amorfo blanco.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.85 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.89 (s, 2H, CH₂SO₂), 7.23 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H₅), 7.31 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₃), 7.32 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H₆'), 7.47 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₂'), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₅'), 7.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 10.28 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 52.9 (CH₃CO₂), 57.0 (CH₂SO), 114.3 (C₁), 117.7 (C₃), 123.1 (C₅), 129.8 (C₆'), 130.7 (C₅'), 131.0 (C₄'), 131.3 (C₂'), 131.7 (C₃'), 132.6 (C₆), 132.8 (C₁'), 139.2 (C₄), 141.0 (C₂), 167.0 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): t_R = 4.82 min. **LC-MS**: 408.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 406.956 ([M]⁺ C₁₅H₁₂NO₄Cl₃S calculada 406.9553).

5-cloro-2-metanol-N-[2-(3,4-diclorofenil)etil]anilina, (1.81)

Sobre una suspensión del intermedio **1.26** (145 mg, 0.39 mmol) y NaBH₄ (74 mg, 1.95 mmol) en 4.5 mL de dioxano, se adiciona gota a gota una solución de AcOH (112 µL, 1.95 mmol) en 2.0 mL de dioxano durante 20 min. La mezcla de reacción se agita a reflujo durante 1.30 h. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida. Se adiciona agua (10 mL) y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3x10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash utilizando un gradiente de 0 a 35% de AcOEt en hexano, obteniéndose 65 mg (Rdto. 46%) del producto **1.81** como un sólido amorfo blanco.

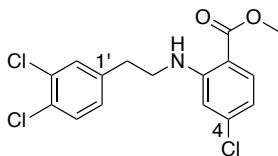


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 3.29-3.35 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 4.33 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂OH), 5.15 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, CH₂OH), 5.35 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CH₂CH₂NH), 6.56 (dd, *J* = 7.9, 2.1 Hz, 1H, H₄), 6.61 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₆), 7.07 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₃), 7.26 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, H_{6'}), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.57 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2'}). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 34.2 (CH₂CH₂NH), 44.2 (CH₂CH₂NH), 61.4 (CH₂OH), 109.8 (C₆), 115.5 (C₄), 125.3 (C_{4'}), 129.4 (C₃), 130.0 (C_{6'}), 131.0 (C_{5'}), 131.5 (C_{2'}), 133.4 (C_{3'}), 141.7 (C_{5,1'}), 148.1 (C₁). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 60-95% de A en B, 5 min): t_R = 3.67 min. **LC-MS (m/z)**: 330.1 ([M+H]⁺).

4-cloro-2-[(3,4-diclorofenetil)amino]benzoato de metilo, (1.82)

Sobre una disolución del intermedio **1.26** (198 mg, 0.53 mmol) en 1 mL de THF a 0°C y en atmósfera de argón, se adiciona gota a gota una solución de BH₃ 1M (5.33 mL, 5.33 mmol) en THF. La mezcla de reacción se agita a 70°C durante 2 h. Cuando se alcanza la temperatura ambiente, se acidifica el crudo de reacción con 1 mL de una disolución de HCl 1.2 M en MeOH. Tras 1 h a reflujo, se elimina el disolvente a presión reducida. Se adiciona agua y se basifica con NaOH 1M a pH 9. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash

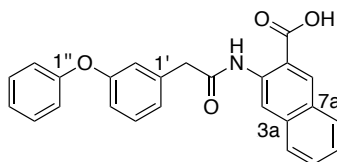
utilizando un gradiente de 0 a 15% de AcOEt en hexano, obteniéndose 77 mg (Rdto. 40%) del producto deseado como un sólido amorfo blanco.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.91 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 3.48 (c, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 3.77 (s, 3H, CO₂CH₃), 6.61 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H₅), 6.87 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₃), 7.30 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.73 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH₂CH₂NH), 7.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 33.4 (CH₂CH₂NH), 42.9 (CH₂CH₂NH), 51.7 (CO₂CH₃), 108.1 (C₁), 111.0 (C₃), 114.6 (C₅), 128.9 (C_{4'}), 129.3, 130.4, 130.8, 132.9, 139.8 (C₄), 140.4, 151.1, 167.4 (C₂), 173.4 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): t_R = 3.55 min. **LC-MS**: 358.2 ([M+H]⁺).

Ácido 3-[2-(3-fenoxifenil)acetilamino]-2-naftoico, (1.83)

Preparado a partir del ácido 2-aminonaftoico (93 mg, 0.50 mmol) y el ácido 3-fenoxifenilacético (171 mg, 0.75 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.83** se aísla por un proceso de trituración con una mezcla 1:1 de éter:CH₂Cl₂ como solvente. Sólido amorfo blanco (120.6 mg). Rdto. 61%.

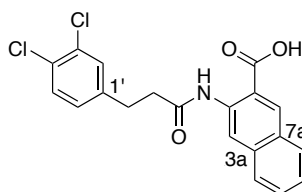


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.81 (s, 2H, CH₂CO), 6.94 (ddd, *J* = 8.2, 2.5, 0.9 Hz, 1H, H_{4'}), 7.03 (dt, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 2H, H_{2'',6''}), 7.07 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H₂), 7.11 (tt, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, H_{4''}), 7.17 (dt, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H, H_{6'}), 7.33-7.41 (m, 3H, H_{5',3'',5''}), 7.47 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H₆), 7.60 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₇), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₄), 8.67 (s, 1H, H₈), 8.94 (s, 1H, H₃), 11.12 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 44.3 (CH₂CO), 116.6 (C₃), 117.3 (C₁), 117.4 (C_{4'}), 118.5 (C_{2'',6''}), 120.0 (C₂), 123.4 (C_{4''}), 124.9, 125.6 (C_{6'}), 127.1, 128.2, 129.1, 129.3, 130.0 (C_{3'',5''}), 130.2 (C₅), 133.1 (C_{7a}), 135.5 (C_{3a}), 136.0 (C₂), 137.0 (C_{1'}), 156.7 (C_{3',1''}), 168.6 (CO₂H), 169.4 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min):

$t_R = 7.04$ min. **LC-MS**: 398.2 ($[M+H]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 397.1306 ($[M]^+$ $C_{25}H_{19}NO_4$ calculada 397.1314).

Ácido 3-[2-(3-(3,4-diclorofenil)propionilamino)]-2-naftoico, (1.84)

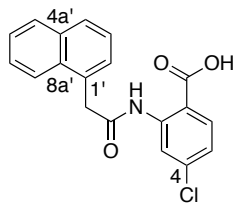
Preparado a partir del ácido 2-aminonaftoico (69 mg, 0.33 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (121 mg, 0.55 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.84** se aísla por un proceso de trituración con una mezcla 1:1 de éter:CH₂Cl₂ como solvente. Sólido amorfo blanco (90.6 mg). Rdto. 77%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.79 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 7.30 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H, H_{6'}), 7.47 (td, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 1H, H₆), 7.53 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_{5'}), 7.57-7.63 (m, 2H, H_{5,2'}), 7.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₇), 8.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₄), 8.67 (s, 1H, H₈), 8.88 (s, 1H, H₃), 11.15 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29.6 (CH₂CH₂CO), 38.2 (CH₂CH₂CO), 116.7 (C₃), 117.7 (C₁), 125.5, 127.1, 128.2, 128.6 (C_{4'}), 129.0 (C_{6'}), 129.1, 129.2, 130.4 (C_{5'}), 130.5 (C_{2'}), 130.8 (C_{3'}), 133.1 (C_{7a}), 135.5 (C_{3a}), 135.9 (C₂), 142.3 (C_{1'}), 169.5 (CO₂H), 170.1 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 7.39$ min. **LC-MS**: 388.2 ($[M+H]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 387.0433 ($[M]^+$ $C_{20}H_{15}NO_3Cl_2$ calculada 387.0429).

Ácido 4-cloro-2-[2-(naftalen-1-il)acetilamino]benzoico, (1.85)

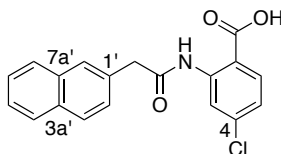
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (85 mg, 0.49 mmol) y el ácido 1-naftalenacético (138 mg, 0.74 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.85** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (117.4 mg). Rdto. 70%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4.73 (s, 2H, CH₂CO), 7.94 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H₅), 8.22-8.29 (m, 3H, H_{2',3',4'}), 8.61-8.71 (m, 5H, H_{6,5',6',7',8'}), 9.42 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 12.04 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 44.7 (CH₂CO), 114.9 (C₁), 119.1 (C₃), 122.6 (C₅), 125.8, 126.2, 127.6, 127.8, 128.1, 128.3, 132.1, 132.7 (C₆), 133.1, 138.5 (C₄), 141.8 (C₂), 168.6 (CO₂H), 170.0 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): t_R = 3.96 min. **LC-MS**: 340.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 339.0675 ([M]⁺ C₁₉H₁₄NO₃Cl calculada 339.0662).

Ácido 4-cloro-2-[2-(naftalen-2-il)acetilamino]benzoico, (1.86)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (98 mg, 0.57 mmol) y el ácido 2-naftalenacético (160 mg, 0.86 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. El producto **1.86** se aísla por un proceso de trituración con éter como solvente. Sólido amorfo blanco (127.7 mg). Rdto. 66%.

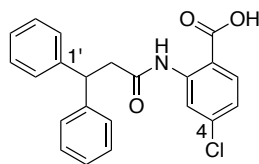


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4.27 (s, 2H, CH₂CO), 7.16 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H₅), 7.50-7.61 (m, 4H, H_{2',4',5',8'}), 7.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.95 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₇), 8.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{3'}), 8.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₃), 11.29 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.5 (CH₂CO), 114.6 (C₁), 118.8 (C₃), 122.5 (C₅), 123.7, 125.7, 125.9, 126.5, 128.0, 128.6, 128.8, 130.6, 131.9, 132.7 (C₆), 133.4, 138.5 (C₄), 141.8 (C₂), 168.5 (CO₂H), 170.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): t_R = 3.84 min. **LC-MS**: 340.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 339.0668 ([M]⁺ C₁₉H₁₄NO₃Cl calculada 339.0662).

Ácido 4-cloro-2-[(3,3-difenil)propionilamino]benzoico, (1.87)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (93 mg, 0.54 mmol) y el ácido 3,3-difenilpropiónico (183 mg, 0.81 mmol) siguiendo el procedimiento general

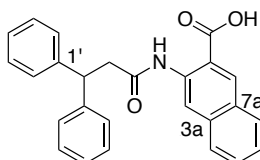
2.1.3, método C. El producto **1.87** se aísla por un proceso de trituración con una mezcla 1:1 de éter:CH₂Cl₂ como solvente. Sólido amorfo blanco (67.7 mg). Rdto. 33%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.25 (s, *J* = 7.9 Hz, 2H, CHCH₂CO), 4.54 (s, 1H, *J* = 7.9 Hz, CHCH₂CO), 7.12-7.20 (m, 3H, H_{5,4'}), 7.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H, H_{3',5'}), 7.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, H_{2',6'}), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₆), 8.48 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 11.29 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43.1 (CHCH₂CO), 46.8 (CHCH₂CO), 115.0 (C₁), 119.1 (C₃), 122.6 (C₅), 126.3 (C_{4'}), 127.6 (C_{2',6'}), 128.5 (C_{3',5'}), 132.9 (C₆), 138.4 (C₄), 141.7 (C₂), 143.9 (C_{1'}), 168.7 (CO₂H), 170.0 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 5 min): *t*_R = 4.61 min. **LC-MS**: 380.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 379.0978 ([M]⁺ C₂₂H₁₈NO₃Cl calculada 379.0975).

Ácido 3-[3,3-difenil)propionilamino]-2-naftoico, (**1.88**)

Preparado a partir del ácido 2-aminonaftoico (90 mg, 0.48 mmol) y el ácido 3,3-difenil-propiónico (164 mg, 0.72 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.1.3, método C. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 60% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (141.8 mg). Rdto. 74%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.25 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, CHCH₂CO), 4.54 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, CHCH₂CO), 7.15 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{4'}), 7.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H, H_{3',5'}), 7.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, H_{2',6'}), 7.45 (td, *J* = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H₆), 7.58 (td, *J* = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₇), 7.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₄), 8.65 (s, 1H, H₈), 8.80 (s, 1H, H₃), 11.17 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43.2 (CHCH₂CO), 46.9 (CHCH₂CO), 94.0, 116.6 (C₃), 117.3 (C₁), 125.5, 126.3 (C_{4'}), 127.0, 127.6 (C_{2',6'}), 128.1, 128.5 (C_{3',5'}), 129.1, 129.3, 133.1 (C_{7a}), 135.5 (C_{3a}), 135.9 (C₂), 144.1 (C_{1'}), 169.3 (CO₂H), 169.4 (CHCH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min):

t_R = 5.13 min. **LC-MS**: 396.2 ($[M+H]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 395.1521 ($[M]^+$ $C_{26}H_{21}NO_3$ calculada 395.1521).

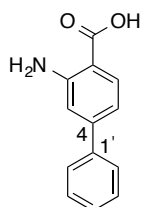
2.2. Capítulo 2

2.2.1. Reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura

En un tubo de microondas de 10 mL de capacidad se añade el correspondiente haluro de arilo (1.0 equiv), el derivado de ácido borónico (1.5 equiv), K_2CO_3 (6 equiv), $[Pd(PPh_3)_4]$ (2%) y 5 mL/mmol de una mezcla THF/ H_2O (4/1). La mezcla de reacción se purga con argón y se calienta irradiando a 100°C durante 30 min en un reactor de microondas. El disolvente se elimina a presión reducida y el sólido resultante se resuspende en agua (10 mL). La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtran y se concentran a presión reducida.

Ácido 4-fenilantranílico, (2.29)

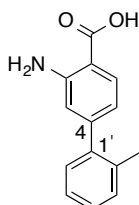
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-clorobenzoico (150 mg, 0.69 mmol) y el ácido fenilborónico (127 mg, 1.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 55% de CH_3CN en H_2O . Sólido amorfo blanco (53.1 mg). Rdto. 34%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 6.80 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H_5), 7.02 (td, J = 1.8 Hz, 1H, H_3), 7.39 (tt, J = 7.4, 1.3 Hz, 1H, $H_{4'}$), 7.47 (td, J = 7.4, 1.3 Hz, 2H, $H_{3',5'}$), 7.60 (dd, J = 7.4, 1.3 Hz, 2H, $H_{2',6'}$), 7.76 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_6). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 108.8 (C_1), 113.5 (C_3), 114.1 (C_5), 126.7 ($C_{3',5'}$), 128.1 ($C_{4'}$), 129.0 ($C_{2',6'}$), 131.9 (C_6), 139.7 (C_4), 145.2 ($C_{1'}$), 151.8 (C_2), 169.5 (CO_2H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 20-95% de A en B, 10 min): t_R = 5.67 min. **LC-MS**: 214.1 ($[M+H]^+$).

Ácido 4-(2-metilfenil)antranílico, (2.35)

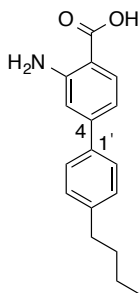
Preparado a partir del ácido 2-amino-4-bromobenzoico (150 mg, 0.69 mmol) y el ácido o-tolilborónico (127 mg, 1.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 0 a 55% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (36 mg). Rdto. 23%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.21 (s, 3H, CH₃), 6.44 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, H₅), 6.66 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H₃), 7.14 (dd, *J* = 6.5, 1.7 Hz, 1H, H_{3'}), 7.19-7.28 (m, 3H, H_{4',5',6'}), 7.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₇). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.2 (CH₃), 108.3 (C₁), 115.8 (C₃), 116.6 (C₅), 125.9 (C_{5'}), 127.6 (C_{4'}), 128.9 (C_{6'}), 130.4 (C_{3'}), 131.1 (C₆), 134.5 (C_{2'}), 141.0 (C₄), 146.7 (C_{1'}), 151.3 (C₂), 169.5 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 20-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 6.22 min. **LC-MS**: 228.0 ([M+H]⁺).

Ácido 4-(4-n-butilfenil)antranílico, (2.36)

Preparado a partir del ácido 2-amino-4-bromobenzoico (130 mg, 0.60 mmol) y el ácido 4-n-butilfenilborónico (160 mg, 0.90 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente:** gradiente de 0 a 65% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (97.9 mg). Rdto. 61%.

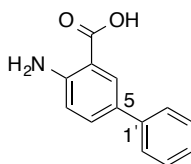


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.32 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.57 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 6.79 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.01 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 7.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.75 (d, *J* = 8.4

Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 21.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 33.1 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 34.5 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 108.6 (C₁), 113.3 (C₃), 113.8 (C₅), 126.5 (C_{2',6'}), 128.9 (C_{3',5'}), 131.9 (C₆), 136.9 (C_{1'}), 142.4 (C₄), 145.1 (C_{4'}), 151.7 (C₂), 169.4 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 20-95% de A en B, 10 min): t_R= 8.33 min. **LC-MS**: 270.2 ([M+H]⁺).

Ácido 5-fenilantranílico, (2.37)

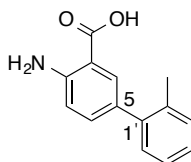
Preparado a partir del ácido 2-amino-5-bromobenzoico (150 mg, 0.69 mmol) y el ácido fenilborónico (127 mg, 1.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 60% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (54.4 mg). Rdto. 37%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 6.83 (d, *J* = 8.6, 1H, H₃), 7.24 (tt, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H, H_{4'}), 7.37 (td, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.53 (td, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.57 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H, H₄), 7.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 109.8 (C₁), 117.1 (C₃), 125.5 (C_{2',6'}), 126.2, 126.5, 128.9 (C_{3',5'}), 132.2 (C₅), 139.8 (C_{1'}), 150.9 (C₂), 169.6 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 20-95% de A en B, 10 min): t_R= 5.60 min. **LC-MS**: 214.1 ([M+H]⁺).

Ácido 5-(2-metilfenil)antranílico, (2.38)

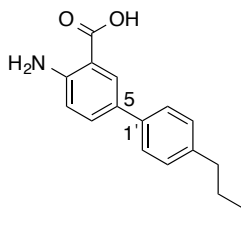
Preparado a partir del ácido 2-amino-5-bromobenzoico (150 mg, 0.69 mmol) y el ácido o-tolilborónico (141 mg, 1.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 55% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (48.7 mg). Rdto. 31%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.22 (s, 3H, CH₃), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₃), 7.12-7.16 (m, 1H, H_{3'}), 7.17-7.27 (m, 4H, H_{4',5',6',4}), 7.63 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.4 (CH₃), 109.7 (C₁), 116.3 (C₃), 126.0, 126.7, 127.5 (C_{4'}), 129.4 (C_{6'}), 130.4 (C_{3'}), 131.3 (C₅), 134.5, 134.7 (C_{2'}), 141.0 (C_{1'}), 150.4 (C₂), 169.7 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 20-95% de A en B, 10 min): t_R = 6.06 min. **LC-MS**: 228.0 ([M+H]⁺).

Ácido 5-(4-n-butilfenil)antranílico, (2.39)

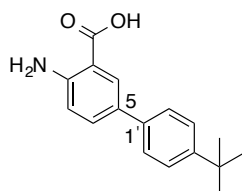
Preparado a partir del ácido 2-amino-5-bromobenzoico (150 mg, 0.69 mmol) y el ácido 4-n-butilfenilborónico (185 mg, 1.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 65% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (43.9 mg). Rdto. 33%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.31 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.55 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 6.93 (d, *J* = 8.6, 1H, H₃), 7.21 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.55 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H, H₄), 7.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 21.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 33.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 34.4 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 109.9 (C₁), 117.1 (C₃), 125.3 (C_{2',6'}), 126.5, 128.6, 128.8 (C_{3',5'}), 132.0 (C₅), 137.2 (C_{1'}), 140.2 (C_{4'}), 150.8 (C₂), 169.6 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 20-95% de A en B, 10 min): t_R = 8.20 min. **LC-MS**: 270.2 ([M+H]⁺).

Ácido 5-(4-terbutilfenil)antranílico, (2.40)

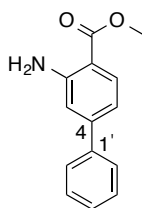
Preparado a partir del ácido 2-amino-5-bromobenzoico (150 mg, 0.69 mmol) y el ácido 4-terbutilfenilborónico (185 mg, 1.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash en fase reversa. **Eluyente**: gradiente de 0 a 65% de CH₃CN en H₂O. Sólido amorfo blanco (30 mg). Rdto. 36%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃C), 6.83 (d, *J* = 8.6, 1H, H₃), 7.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.56 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H, H₄), 7.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31.8 (CH₃)₃C, 34.8 (CH₃)₃C, 110.5 (C₁), 117.7 (C₃), 125.8 (C_{2',6'}), 126.3 (C_{3',5'}), 127.1, 129.2, 132.7 (C₅), 137.6 (C_{1'}), 149.2 (C_{4'}), 151.4 (C₂), 170.2 (CO₂H). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 20-95% de A en B, 10 min): t_R = 7.75 min. **LC-MS**: 271.1 ([M+2H]⁺).

2-amino-4-fenilbenzoato de metilo, (2.42)

Preparado a partir del 2-amino-4-bromobenzoato de metilo (200 mg, 0.87 mmol) y el ácido fenilborónico (212 mg, 1.74 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (150 mg). Rdto. 76%.

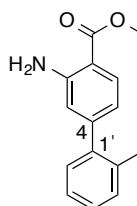


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.81 (CO₂CH₃), 6.71 (s, 2H, NH₂), 6.83 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H, H₅), 7.06 (td, *J* = 1.6 Hz, 1H, H₃), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.61 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 51.4 (CO₂CH₃), 107.9 (C₁), 113.6 (C₃), 114.2 (C₅), 126.6 (C_{3',5'}), 128.2 (C_{4'}), 128.9 (C_{2',6'}), 131.3 (C₆), 139.4 (C₄), 145.4 (C_{1'}), 151.6 (C₂), 167.6 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 3.72 min. **LC-MS**: 228.0 ([M+H]⁺).

2-amino-4-(2'-metilfenil)benzoato de metilo, (2.43)

Preparado a partir del 2-amino-4-bromobenzoato de metilo (200 mg, 0.87 mmol) y el ácido o-tolilborónico (236 mg, 1.04 mmol), siguiendo el procedimiento general

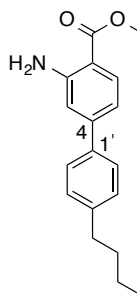
2.2.1. Purificación por cromatografía flash en cartuchos de gel de sílice. **Eluyente:** gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (170.6 mg). Rdto. 81%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.22 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, CH₃CO₂), 6.49 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, H₅), 6.70 (s, 2H, NH₂), 6.72 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H₃), 7.14 (dd, *J* = 6.4, 1.8 Hz, 1H, H_{3'}), 7.21-7.30 (m, 3H, H_{4',5',6'}), 7.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₇). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.0 (CH₃), 51.4 (CO₂CH₃), 107.5 (C₁), 116.0 (C₃), 116.7 (C₅), 125.9 (C_{5'}), 127.6 (C_{4'}), 128.8 (C_{6'}), 130.4 (C_{3'}), 130.5 (C₆), 134.5 (C_{2'}), 140.8 (C₄), 147.0 (C_{1'}), 151.1 (C₂), 167.7 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 4.75 min. **LC-MS (m/z)**: 241.9 ([M+H]⁺).

2-amino-4-(4'-n-butilfenil)benzoato de metilo, (2.44)

Preparado a partir del 2-amino-4-bromobenzoato de metilo (360 mg, 1.56 mmol) y el ácido 4-n-butilfenilborónico (418 mg, 2.35 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente:** gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (392.5 mg). Rdto. 88%.

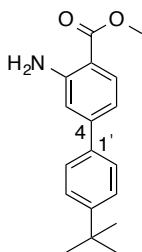


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.31 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.56 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.60 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 3.80 (s, 3H, CH₃CO₂), 6.71 (s, 2H, NH₂), 6.81 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 7.28 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 21.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 33.1 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 34.5 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 51.4 (CO₂CH₃), 107.6 (C₁), 113.5 (C₃), 113.9 (C₅), 126.5 (C_{2',6'}),

128.9 ($C_{3',5'}$), 131.3 (C_6), 136.8 ($C_{1'}$), 142.5 (C_4), 145.4 ($C_{4'}$), 151.6 (C_2), 167.7 ($\underline{CO_2CH_3}$). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 6.56 min. **LC-MS**: 284.2 ($[M+H]^+$).

2-amino-4-(4'-terbutiletilfenil)benzoato de metilo, (2.45)

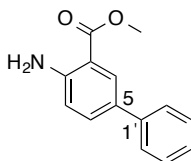
Preparado a partir del 2-amino-4-bromobenzoato de metilo (200 mg, 0.87 mmol) y el ácido 4-terbutilfenilborónico (232 mg, 1.31 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (164.8 mg). Rdto: 67%.



1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 1.81 (s, 9H, $(CH_3)_3C$), 3.80 (s, 3H, CO_2CH_3), 6.72 (s, 2H, NH_2), 6.88 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H, H_5), 7.05 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H_3), 7.48 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $H_{3',5'}$), 7.55 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $H_{2',6'}$), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H_6). **^{13}C -NMR** (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 31.1 ($\underline{CH_3}_3C$), 34.3 ($CH_3)_3C$), 55.4 (CO_2CH_3), 107.7 (C_1), 113.5 (C_3), 113.9 (C_5), 125.7 ($C_{2',6'}$), 126.3 ($C_{3',5'}$), 131.3 (C_6), 136.5 ($C_{1'}$), 145.3 (C_4), 150.8 ($C_{4'}$), 151.6 (C_2), 167.7 ($\underline{CO_2CH_3}$). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 60-95% de A en B, 10 min): t_R = 5.62 min. **LC-MS**: 284.24 ($[M+H]^+$).

2-amino-5-fenilbenzoato de metilo, (2.46)

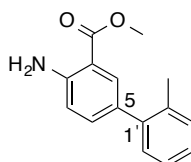
Preparado a partir del 2-amino-5-bromobenzoato de metilo (200 mg, 0.87 mmol) y el ácido fenilborónico (212 mg, 1.74 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 25% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (128.2 mg). Rdto: 66%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.83 (s, 3H, CO₂CH₃), 6.77 (s, 2H, NH₂), 6.89 (d, *J* = 8.7, 1H, H₃), 7.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₄), 7.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.55 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.61 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H, H₄), 7.98 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 51.5 (CO₂CH₃), 109.0 (C₁), 117.3 (C₃), 125.4 (C_{2',6'}), 126.2, 126.7, 128.2, 128.8 (C_{3',5'}), 132.4 (C₅), 139.6 (C_{1'}), 150.7 (C₂), 167.7 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 3.82 min. **LC-MS**: 228.3 ([M+H]⁺).

2-amino-5-(2'-metilfenil)benzoato de metilo, (2.47)

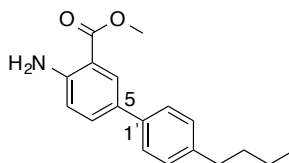
Preparado a partir del 2-amino-5-bromobenzoato de metilo (200 mg, 0.87 mmol) y el ácido o-tolilborónico (177 mg, 1.31 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Aceite incoloro (79.8 mg). Rdto. 76%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.22 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, CO₂CH₃), 6.72 (s, 2H, NH₂), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₃), 7.12-7.25 (m, 4H, H_{3',5',6',4'}), 7.27 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H₄), 7.63 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.2 (CH₃), 51.4 (CO₂CH₃), 108.4 (C₁), 116.4 (C₃), 126.7, 127.7 (C_{4'}), 129.3 (C_{6'}), 130.3 (C_{3'}), 130.6 (C₅), 134.7, 134.8 (C_{2'}), 141.7 (C_{1'}), 150.2 (C₂), 167.7 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 4.64 min. **LC-MS (m/z)**: 242.3 ([M+H]⁺).

Síntesis de 2-amino-5-(4'-n-butilfenil)benzoato de metilo, (2.48)

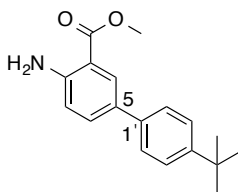
Preparado a partir del 2-amino-5-bromobenzoato de metilo (360 mg, 1.57 mmol) y el ácido 4-n-butilfenilborónico (418 mg, 2.35 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 15% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (338 mg). Rdto. 76%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.31 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.56 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.58 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 3.82 (s, 3H, CO₂CH₃), 6.75 (s, 2H, NH₂), 6.87 (d, *J* = 8.6, 1H, H₃), 7.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.59 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H, H₄), 7.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 21.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 33.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 34.4 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 51.5 (CO₂CH₃), 108.9 (C₁), 117.3 (C₃), 125.3 (C_{2',6'}), 126.7, 127.9, 128.8 (C_{3',5'}), 132.4 (C₅), 137.0 (C_{1'}), 140.3 (C_{4'}), 150.5 (C₂), 167.8 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 7.81 min. **LC-MS (m/z)**: 284.0 ([M+H]⁺).

Síntesis de 2-amino-5-(4'-terbutiletilfenil)-benzoato de metilo, (2.49)

Preparado a partir del 2-amino-5-bromobenzoato de metilo (200 mg, 0.87 mmol) y el ácido 4-terbutilfenilborónico (232 mg, 1.31 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.1. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (179.6 mg). Rdto. 73%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃C), 3.82 (s, 3H, CO₂CH₃), 6.74 (s, 2H, NH₂), 6.87 (d, *J* = 8.6, 1H, H₃), 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.58 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H, H₄), 7.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₆). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31.2 ((CH₃)₃C), 34.2 ((CH₃)₃C), 51.6 (CO₂CH₃), 109.0 (C₁), 117.4 (C₃), 125.2 (C_{2',6'}), 125.7 (C_{3',5'}), 126.7, 128.1, 132.5 (C₅), 136.9 (C_{1'}), 148.7 (C_{4'}), 150.6 (C₂), 167.9 (CO₂CH₃). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 7.82 min. **LC-MS**: 284.2 ([M+H]⁺).

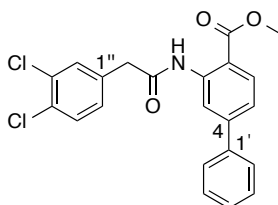
2.2.2. Síntesis de amidas 2.51-2.66

Una disolución del correspondiente ácido carboxílico (1.5 equiv) en SOCl₂ (2 mL/mmol) como disolvente, se calienta a reflujo durante 6 h. Transcurrido el tiempo de reacción, el exceso de SOCl₂ se elimina a presión reducida. Sobre la disolución del cloruro de ácido formado en THF anhidro (2 mL/mmol) se adiciona la amina correspondiente (1.0 equiv) y óxido de propileno (15.0 equiv). La reacción se agita a

temperatura ambiente durante toda la noche. El disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se extrae con AcOEt (3x10 mL) y se lava con disolución saturada de NaCl (30 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra a vacío. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de media presión.

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-fenilbenzoato de metilo, (2.51)

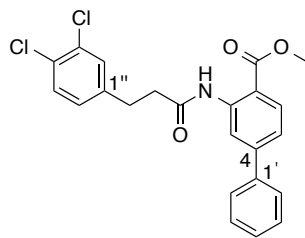
Preparado a partir del intermedio **2.42** (50 mg, 0.22 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (68 mg, 0.33 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente:** gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (64.4 mg). Rdto. 71%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.83 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.85 (s, 2H, CH₂CO), 7.37 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.41-7.46 (m, 1H, H_{4'}), 7.47-7.53 (m, 3H, H_{5,3',5'}), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.65-7.69 (m, 3H, H_{2',6',2''}), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.56 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 11.73 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43.1 (CH₂CO), 53.0 (CO₂CH₃), 117.5 (C₁), 119.9 (C₃), 122.4 (C₅), 127.5 (C_{2',6'}), 129.3 (C_{4''}), 129.8 (C_{3',5'}), 130.3 (C_{4'}), 130.8 (C_{6''}), 131.2 (C_{5''}), 131.5 (C_{3''}), 131.9 (C₆), 132.4 (C_{2''}), 136.8 (C_{1'}), 139.3 (C₂), 140.5 (C_{1''}), 146.0 (C₄), 167.9 (CO₂CH₃), 169.6 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 8.77 min. **LC-MS**: 414.1 ([M+H]⁺).

2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-4-fenilbenzoato de metilo, (2.52)

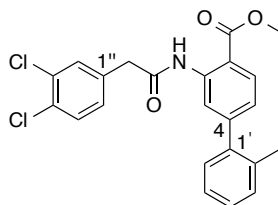
Preparado a partir del intermedio **2.42** (40 mg, 0.18 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (58 mg, 0.26 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente:** gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (53.2 mg). Rdto: 70%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.28 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.45 (tt, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H, H_{4'}), 7.49-7.55 (m, 4H, H_{5'',3',5',5}), 7.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.67 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.56 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 10.63 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29.6 (CH₂CH₂CO), 38.0 (CH₂CH₂CO), 52.5 (CO₂CH₃), 116.4 (C₁), 119.1 (C₃), 121.5 (C₅), 126.9 (C_{2',6'}), 128.6 (C_{4''}), 128.7 (C_{4'}), 128.9 (C_{6''}), 129.2 (C_{3',5'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{2''}), 130.8 (C_{3''}), 131.3 (C₆), 138.8 (C_{1'}), 140.1 (C₂), 142.1 (C_{1''}), 145.4 (C₄), 167.4 (CO₂CH₃), 170.5 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.27 min. **LC-MS (m/z)**: 428.3 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(2'-metilfenil)benzoato de metilo, (2.53)

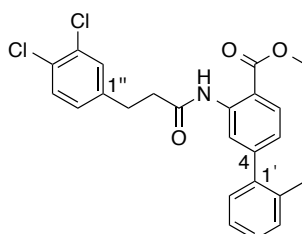
Preparado a partir del intermedio **2.43** (40 mg, 0.17 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (51 mg, 0.25 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 20% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (33.4 mg). Rdto. 47%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.23 (s, 3H, CH₃), 3.82 (s, 5H, CO₂CH₃, CH₂CO), 7.19 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.20-7.22 (m, 1H, H_{6'}), 7.25-7.30 (m, 1H, H_{5'}), 7.30-7.33 (m, 2H, H_{3',4'}), 7.35 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H_{6''}), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.65 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{2''}), 7.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₆), 8.20 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 10.70 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.1 (CH₃), 42.5 (CH₂CO), 52.4 (CO₂CH₃), 116.6 (C₁), 121.8 (C₃), 126.2 (C₅), 126.2 (C_{5'}), 128.1 (C_{4'}), 129.2 (C_{6'}), 129.6 (C_{4''}), 130.1 (C_{6''}), 130.5 (C_{3',5'}), 130.6 (C₆), 130.9 (C_{3''}), 131.7 (C_{2''}), 134.6 (C_{2'}), 136.2 (C_{1''}), 139.1 (C₂), 140.0 (C_{1'}), 146.7 (C₄), 167.3 (CO₂CH₃), 168.9 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.23 min. **LC-MS**: 428.3 ([M+H]⁺).

2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-4-(2'-metilfenil)benzoato de metilo, (2.54)

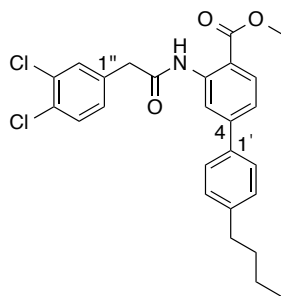
Preparado a partir del intermedio **2.43** (40 mg, 0.17 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (55 mg, 0.25 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 15% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (49.6 mg). Rdto. 67%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.17 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{6'}), 7.27 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.29-7.35 (m, 2H, H_{3',5'}), 7.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.56 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.96 (d, *J* = 8.1 Hz, H₆), 8.23 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 10.62 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.1 (H₃), 29.5 (CH₂CH₂CO), 37.9 (CH₂CH₂CO), 52.4 (CO₂CH₃), 116.1 (C₁), 121.6 (C₃), 123.9 (C₅), 126.1 (C_{5'}), 128.1 (C_{4'}), 128.6 (C_{4''}), 128.9 (C_{6''}), 129.1 (C_{6'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{2''}), 130.5 (C₆), 130.6 (C_{3'}), 130.8 (C_{3''}), 134.6 (C_{2'}), 139.4 (C₂), 140.0 (C_{1'}), 142.1 (C_{1''}), 146.7 (C₄), 167.4 (CO₂CH₃), 170.4 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.74 min. **LC-MS (m/z)**: 442.2 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(4'-n-butilfenil)benzoato de metilo, (2.55)

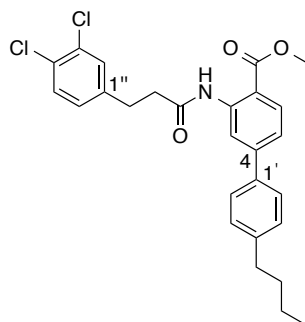
Preparado a partir del intermedio **2.44** (60 mg, 0.21 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (65 mg, 0.32 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (71.5 mg). Rdto. 72%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 0.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.31 (sx, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.57 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.62 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.83 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.85 (s, 2H, CH_2CO), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.37 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.49 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 1H, H_5), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 7.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.67 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.96 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_6), 8.55 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_3), 10.73 (s, 1H, NH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 13.8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 34.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 42.5 (CH_2CO), 52.4 (CO_2CH_3), 116.4 (C_1), 118.9 (C_3), 121.4 (C_5), 126.8 ($\text{C}_{2',6'}$), 129.1 ($\text{C}_{3',5'}$), 129.6 ($\text{C}_{4''}$), 130.1 ($\text{C}_{6''}$), 130.5 ($\text{C}_{5''}$), 130.9 ($\text{C}_{3''}$), 131.2 (C_6), 131.7 ($\text{C}_{2''}$), 136.0 ($\text{C}_{1'}$), 136.2 ($\text{C}_{1''}$), 139.9 (C_2), 143.1 (C_4), 145.3 (C_4), 167.3 (CO_2CH_3), 168.9 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 3.97$ min. **LC-MS (m/z)**: 470.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-4-(4'-n-butilfenil)benzoato de metilo, (2.56)

Preparado a partir del intermedio **2.44** (40 mg, 0.14 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (46 mg, 0.22 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (52.2 mg). Rdto. 78%.

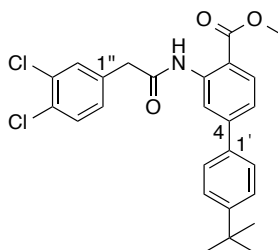


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.32 (sx, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.58 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.63

(t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.78 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.86 (s, 3H, CO_2CH_3), 7.29 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.47 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 1H, H_5), 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 7.58 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.97 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_6), 8.57 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_3), 10.64 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 13.8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 33.0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 34.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 37.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 52.4 (CO_2CH_3), 115.9 (C_1), 118.7 (C_3), 121.1 (C_5), 126.7 ($\text{C}_{2',6'}$), 128.6 (C_4''), 128.9 (C_6''), 129.1 ($\text{C}_{3',5'}$), 130.4 ($\text{C}_{5''}$), 130.5 ($\text{C}_{2''}$), 130.8 ($\text{C}_{3''}$), 131.2 (C_6), 136.1 (C_1'), 140.1 (C_2), 142.1 (C_1''), 143.1 (C_4'), 145.3 (C_4), 167.4 (CO_2CH_3), 170.4 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): $t_R = 7.96$ min. **LC-MS** (m/z): 484.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(4'-terbutilfenil)benzoato de metilo, (2.57)

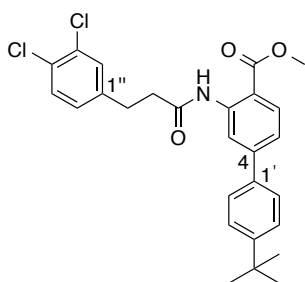
Preparado a partir del intermedio **2.45** (40 mg, 0.14 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (43 mg, 0.21 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 20% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (45.7 mg). Rdto. 69%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.30 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 3.82 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.84 (s, 2H, CH_2CO), 7.37 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.48, (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H, H_5), 7.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 7.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.67 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.96 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_6), 8.55 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H_3), 10.74 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 31.1 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 34.4 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 42.5 (CH_2CO), 52.4 (CO_2CH_3), 116.5 (C_1), 118.9 (C_3), 121.5 (C_5), 126.0 ($\text{C}_{2',6'}$), 126.6 ($\text{C}_{3',5'}$), 129.6 (C_4''), 130.1 (C_6''), 130.5 ($\text{C}_{5''}$), 130.9 ($\text{C}_{3''}$), 131.3 (C_6), 131.7 ($\text{C}_{2''}$), 135.8 (C_1'), 136.2 (C_1''), 139.9 (C_2), 145.2 (C_4), 151.3 (C_4'), 167.3 (CO_2CH_3), 168.9 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 6.44$ min. **LC-MS** (m/z): 470.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-4-(4'-terbutilfenil)benzoato de metilo, (2.58)

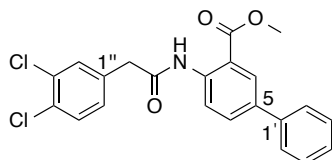
Preparado a partir del intermedio **2.45** (40 mg, 0.14 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (46 mg, 0.21 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente:** gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (49.3 mg). Rdto. 72%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃C), 2.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 3.85 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.28 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6'}), 7.47 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2'}), 7.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.57 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 10.65 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29.6 (CH₂CH₂CO), 31.1 (CH₃)₃C), 34.4 (CH₃)₃C), 38.0 (CH₂CH₂CO), 52.4 (CO₂CH₃), 116.0 (C₁), 118.7 (C₃), 121.2 (C₅), 126.0 (C_{2',6'}), 126.6 (C_{3',5'}), 128.6 (C_{4'}), 129.0 (C_{6'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{2''}), 130.8 (C_{3''}), 131.2 (C₆), 135.9 (C_{1'}), 140.2 (C₂), 142.1 (C_{1''}), 145.3 (C₄), 151.3 (C_{4'}), 167.4 (CO₂CH₃), 170.4 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 7.08 min. **LC-MS (m/z):** 484.3 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-fenilbenzoato de metilo, (2.59)

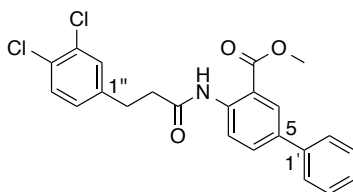
Preparado a partir del intermedio **2.46** (40 mg, 0.18 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (54 mg, 0.26 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente:** gradiente de 0 a 15% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (58.2 mg). Rdto. 80%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.82 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.83 (s, 2H, CH₂CO), 7.35-7.40 (m, 2H, H_{4',6''}), 7.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.65-7.69 (m, 3H, H_{2',6',2''}), 7.92 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, H₄), 8.12 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆), 8.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₃), 10.64 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.4 (CH₂CO), 52.4 (CO₂CH₃), 119.2 (C₁), 122.2 (C₃), 126.4 (C_{2',6'}), 127.7 (C_{4'}), 128.2 (C₆), 129.1 (C_{3',5'}), 129.6 (C_{4''}), 130.0 (C_{6''}), 130.5 (C_{2''}), 130.9 (C_{3''}), 131.6 (C_{5''}), 131.8 (C₄), 135.2 (C₅), 136.3 (C_{1''}), 138.2 (C_{1'}), 138.5 (C₂), 167.3 (CO₂CH₃), 168.7 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 8.50 min. **LC-MS (m/z)**: 414.2 ([M+H]⁺).

2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-fenilbenzoato de metilo, (2.60)

Preparado a partir del intermedio **2.46** (40 mg, 0.18 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (48 mg, 0.26 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 15% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (67.5 mg). Rdto. 62%.

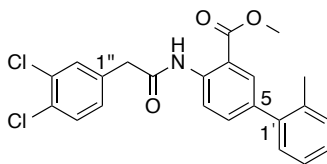


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.76 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.28 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.38 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{4'}), 7.48 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.57 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.91 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, H₄), 8.12 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆), 8.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₃), 10.54 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29.7 (CH₂CH₂CO), 37.9 (CH₂CH₂CO), 52.6 (CO₂CH₃), 118.7 (C₁), 122.0 (C₃), 126.4 (C_{2',6'}), 127.7 (C_{4'}), 128.2 (C₆), 128.7 (C_{4''}), 129.0 (C_{6''}), 129.2 (C_{3',5'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{2''}), 130.9 (C_{3''}), 131.9 (C₄), 135.0 (C₅), 138.6 (C_{1',2}), 142.2 (C_{1''}), 167.4 (CO₂CH₃), 170.4 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.10 min. **LC-MS (m/z)**: 428.2 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-(2'-metilfenil)benzoato de metilo, (2.61)

Preparado a partir del intermedio **2.47** (40 mg, 0.17 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (51 mg, 0.25 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2.

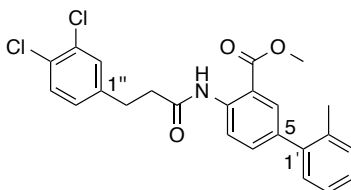
Purificación por cromatografía flash. **Eluyente:** gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco. Rdto. 84%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.21 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.83 (s, 2H, CH₂CO), 7.18-7.22 (m, 1H, H_{6'}), 7.23-7.32 (m, 3H, H_{3',4',5'}), 7.37 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.60 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H, H₄), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.78 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₆), 8.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₃), 10.64 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.1 (CH₃), 42.4 (CH₂CO), 52.4 (CO₂CH₃), 118.6 (C₁), 121.4 (C₃), 126.1 (C_{5'}), 127.7 (C_{4'}), 129.4 (C_{6'}), 129.6 (C_{4''}), 130.0 (C_{6''}), 130.4 (C_{3'}), 130.5 (C_{5''}), 130.6 (C₆), 130.9 (C_{3''}), 131.6 (C_{2''}), 134.2 (C₄), 134.8 (C_{2'}), 136.3 (C_{5,1''}), 137.8 (C₂), 139.7 (C_{1'}), 167.2 (CO₂CH₃), 168.7 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 9.28 min. **LC-MS (*m/z*)**: 428.3 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-(2'-metilfenil)benzoato de metilo, (2.62)

Preparado a partir del intermedio **2.47** (40 mg, 0.17 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (54 mg, 0.25 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente:** gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (72.5 mg). Rdto. 99%.

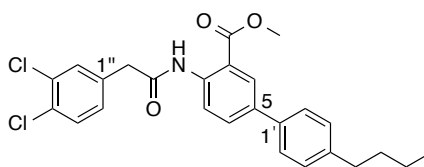


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 3.83 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.18-7.22 (m, 1H, H_{6'}), 7.23-7.33 (m, 4H, H_{3',4',5',6''}), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.59 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H₄), 7.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₆), 8.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₅), 10.55 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.1 (CH₃), 29.6 (CH₂CH₂CO), 37.9 (CH₂CH₂CO), 52.5 (CO₂CH₃), 118.0 (C₁), 121.2 (C₃), 126.1 (C_{5'}), 127.7 (C_{4'}), 128.6 (C_{4''}), 129.0 (C_{6''}), 129.5 (C_{6'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{3'}), 130.5 (C_{2''}), 130.6 (C₆),

130.8 (C_{3''}), 134.3 (C₄), 134.8 (C_{2'}), 136.0 (C₅), 138.0 (C₂), 139.7 (C_{1'}), 142.2 (C_{1''}), 167.4 (CO₂CH₃), 170.3 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.80 min. **LC-MS (m/z)**: 442.2 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-(4'-n-butilfenil)benzoato de metilo, (2.63)

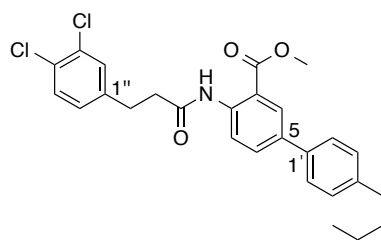
Preparado a partir del intermedio **2.48** (40 mg, 0.14 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (43 mg, 0.21 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (44.5 mg). Rdto. 67%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.32 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.56 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 3.82 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.82 (s, 2H, CH₂CO), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.36 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.57 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.89 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, H₄), 8.09 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆), 8.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₃), 10.62 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 21.7 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 33.1 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 34.1 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 42.4 (CH₂CO), 52.4 (CO₂CH₃), 119.2 (C₁), 122.2 (C₃), 126.2 (C_{2',6'}), 127.9 (C₆), 129.0 (C_{3',5'}), 129.6 (C_{4''}), 130.0 (C_{6''}), 130.5 (C_{5''}), 130.9 (C_{3''}), 131.5 (C₄), 131.6 (C_{2''}), 135.2 (C₅), 135.8 (C_{1'}), 136.3 (C_{1''}), 138.0 (C₂), 142.0 (C_{4'}), 167.3 (CO₂CH₃), 168.6 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): t_R = 7.15 min. **LC-MS (m/z)**: 470.2 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-(4'-n-butilfenil)benzoato de metilo, (2.64)

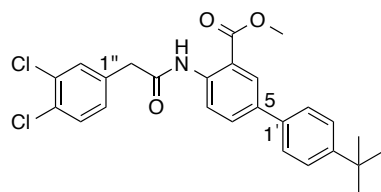
Preparado a partir del intermedio **2.48** (40 mg, 0.14 mmol) y el ácido 3-(3,4-diclorofenil)propanoico (46 mg, 0.21 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 10% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (56.4 mg). Rdto. 81%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.32 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.56 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.76 (, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.28 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H, H_{6''}), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.56 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{2''}), 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.89 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, H₄), 8.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆), 8.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₃), 10.53 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 21.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 29.6 (CH₂CH₂CO), 33.2 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 34.4 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 37.9 (CH₂CH₂CO), 52.5 (CO₂CH₃), 118.6 (C₁), 121.9 (C₃), 126.2 (C_{2',6'}), 129.7 (C₆), 128.6 (C_{4''}), 128.9 (C_{6''}), 129.0 (C_{3',5'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{2''}), 130.8 (C_{3''}), 131.7 (C₄), 134.9 (C₅), 135.9 (C_{1'}), 138.3 (C₂), 141.9 (C_{4'}), 142.2 (C_{1''}), 167.4 (CO₂CH₃), 170.2 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): t_R = 7.88 min. **LC-MS (m/z)**: 484.4 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-(4'-terbutilfenil)benzoato de metilo, (2.65)

Preparado a partir del intermedio **2.49** (42 mg, 0.15 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (46 mg, 0.22 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 20% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (44.2 mg). Rdto. 63%.

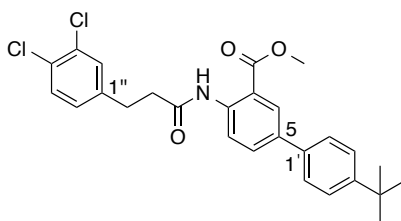


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃C), 3.80 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.81 (s, 2H, CH₂CO), 7.36 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.88 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H, H₄), 8.08 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆), 8.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₃), 10.61 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31.1 (CH₃)₃C), 34.4

(CH₃)₃C), 42.5 (CH₂CO), 52.5 (CO₂CH₃), 119.5 (C₁), 122.4 (C₃), 126.0 (C_{2',6'}), 126.2 (C_{3',5'}), 128.1 (C₆), 129.7 (C_{4''}), 130.1 (C_{6''}), 130.6 (C_{5''}), 131.0 (C_{3''}), 131.6 (C₄), 131.7 (C_{2''}), 135.6 (C₅), 135.7 (C_{1'}), 136.4 (C_{1''}), 138.0 (C₂), 150.3 (C_{4'}), 167.4 (CO₂CH₃), 168.8 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): t_R = 6.23 min. **LC-MS (m/z)**: 470.3 ([M+H]⁺).

2-[2-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-(4'-tert-butilfenil)benzoato de metilo, (2.66)

Preparado a partir del intermedio **2.49** (40 mg, 0.14 mmol) y el ácido 3,4-diclorofenilacético (46 mg, 0.21 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.2. Purificación por cromatografía flash. **Eluyente**: gradiente de 0 a 15% de AcOEt en hexano. Sólido amorfo blanco (41.1 mg). Rdto. 60%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.31 (s, 9H), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.29 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.57-7.61 (m, 3H, H_{2',6',2''}), 7.89 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, H₄), 8.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆), 8.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₃), 10.52 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29.6 (CH₂CH₂CO), 31.1 (CH₃)₃C), 34.2 (CH₃)₃C), 37.8 (CH₂CH₂CO), 52.4 (CO₂CH₃), 118.6 (C₁), 121.9 (C₃), 125.8 (C_{2',6'}), 126.0 (C_{3',5'}), 127.9 (C₆), 128.6 (C_{4''}), 128.9 (C_{6''}), 130.3 (C_{5''}), 130.4 (C_{2''}), 130.8 (C_{3''}), 131.6 (C₄), 134.8 (C₅), 135.7 (C_{1'}), 138.3 (C₂), 142.1 (C_{1''}), 150.1 (C_{4'}), 167.4 (CO₂CH₃), 170.2 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.17 min **LC-MS (m/z)**: 484.4 ([M+H]⁺).

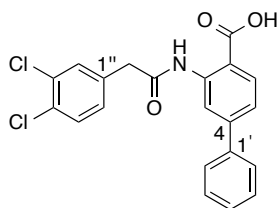
2.2.3. Saponificación del grupo éster

A una disolución del correspondiente éster en 1.33 mL/mmol de THF y 0.66 mL/mmol de MeOH, se adiciona gota a gota una solución de NaOH 2N (0.22 mL/mmol). Tras 12 h de agitación a temperatura ambiente, se elimina el disolvente a presión reducida, se añade agua (5 mL) y se acidifica con HCl 1N a pH 3 o 4. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x5 mL). Los extractos orgánicos se lavan una disolución

saturada de NaCl (15 mL), se secan sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a sequedad. El residuo se disuelve en 3 mL de una mezcla H₂O:CH₃CN (1:0.3) y tras liofilización, se obtiene el compuesto deseado como un sólido amorfo y alta pureza, sin necesidad de purificaciones adicionales.

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-fenilbenzoico, (2.1)

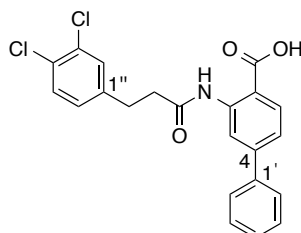
Preparado a partir del **2.51** (29 mg, 0.07 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (25.5 mg). Rdto. 91%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.87 (s, 2H, CH₂CO), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.44 (m, 1H, H_{4'}), 7.46 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.68 (dd, *J* = 7.4, 1.8 Hz, 2H, H_{2',6'}), 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₆), 8.83 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 11.73 (s, 1H, NH), 13.23-13.89 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 42.9 (CH₂CO), 115.4 (C₁), 117.9 (C₃), 121.1 (C₅), 126.9 (C_{2',6'}), 128.6 (C_{4''}), 129.1 (C_{3',5'}), 129.7 (C_{4'}), 130.3 (C_{6''}), 130.5 (C_{5''}), 130.9 (C_{3''}), 131.8 (C₆), 131.9 (C_{2''}), 135.9 (C_{1'}), 138.9 (C₂), 141.1 (C_{1''}), 145.4 (C₄), 169.0 (CO₂H), 169.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 70-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 2.57 min. **LC-MS**: 400.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** *m/z* encontrada 399.0434 ([M]⁺ + C₂₁H₁₅NO₃Cl₂ calculada 399.0429).

Ácido 2-[3-(3,4-diclorofenil)-propionilamino]-4-fenilbenzoico, (2.2)

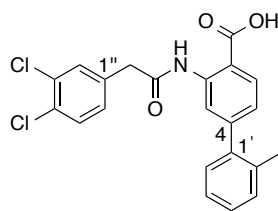
Preparado a partir del intermedio **2.52** (25 mg, 0.08 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (22.1 mg). Rdto. 89%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.79 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 7.30 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6''}), 7.42-7.47 (m, 1H, H_{4'}), 7.59-7.55 (m, 4H, H_{5'',3',5',5}), 7.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2''}), 7.67 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 2H, H_{2',6'}), 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.81 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 11.20 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 29.4 (CH₂CH₂CO), 38.2 (CH₂CH₂CO), 115.3 (C₁), 117.9 (C₃), 120.9 (C₅), 126.9 (C_{2',6'}), 128.6 (C_{4''}), 128.7 (C_{4'}), 128.9 (C_{6''}), 129.2 (C_{3',5'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{2''}), 130.8 (C_{3''}), 131.8 (C₆), 139.0 (C_{1'}), 141.2 (C₂), 142.1 (C_{1''}), 145.4 (C₄), 169.3 (CO₂H), 170.4 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 6.58 min. **LC-MS (m/z)**: 414.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 413.0592 ([M]⁺ C₂₂H₁₇NO₃Cl₂ calculada 413.0585).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(2'-metilfenil)benzoico, (2.3)

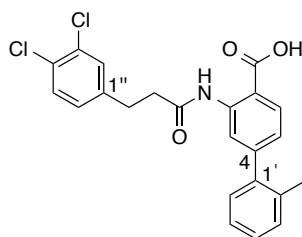
Preparado a partir del intermedio **2.53** (34 mg, 0.08 mmol), siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (30.5 mg). Rdto. 92%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.23 (s, 3H, CH₃), 3.84 (s, 2H, CH₂CO), 7.13 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.16-7.21 (m, 1H, H_{6'}), 7.23-7.32 (m, 3H, H_{5',3',4'}), 7.36 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6''}), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.67 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2''}), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₆), 8.49 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 11.20 (s, 1H, NH), 13.34-13.81 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.1 (CH₃), 42.9 (CH₂CO), 115.1 (C₁), 120.5 (C₃), 123.5 (C₅), 126.1 (C_{5'}), 128.0 (C_{4'}), 129.1 (C_{6'}), 129.7 (C_{4''}), 130.3 (C_{6''}), 130.5 (C_{3',5''}), 130.9 (C₆), 131.0 (C_{3''}), 131.9 (C_{2''}), 134.6 (C_{2'}), 135.9 (C_{1''}), 140.2 (C₂), 140.4 (C_{1'}), 146.8 (C₄), 168.9 (CO₂H), 169.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 6.75 min. **LC-MS (m/z)**: 414.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 413.0603 ([M]⁺ C₂₂H₁₇NO₃Cl₂ calculada 413.0585).

Ácido 2-[3-(3,4-diclorofenil)propanoilamino]-4-(2'-metilfenil)benzoico, (2.4)

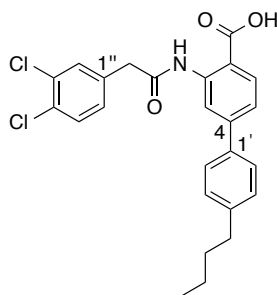
Preparado a partir del intermedio **2.54** (35 mg, 0.08 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (32.3 mg). Rdto. 92%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 7.12 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.21 (m, 1H, H_{6'}), 7.29 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, H_{6''}), 7.30-7.34 (m, 2H, H_{3',5'}), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.56 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{2''}), 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, H₆), 8.47 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 11.17 (s, 1H, NH), 13.26-13.87 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.1 (CH₃), 29.4 (CH₂CH₂CO), 38.2 (CH₂CH₂CO), 114.9 (C₁), 120.4 (C₃), 123.3 (C₅), 126.1 (C_{5'}), 128.0 (C_{4'}), 128.6 (C_{4''}), 128.9 (C_{6''}), 129.1 (C_{6'}), 130.4 (C_{5''}), 130.5 (C_{2''}), 130.5 (C₆), 130.7 (C_{3'}), 131.0 (C_{3''}), 134.6 (C_{2'}), 140.2 (C₂), 140.0 (C_{1'}), 140.5 (C_{1''}), 142.1 (C₄), 169.3 (CO₂H), 170.3 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): *t*_R = 7.19 min. **LC-MS (m/z)**: 428.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 427.0728 ([M]⁺ C₂₃H₁₉NO₃Cl₂ calculada 427.0742).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(4'-n-butilfenil)benzoico, (2.9)

Preparado a partir del intermedio **2.55** (29 mg, 0.06 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (27.4 mg). Rdto. 94%.

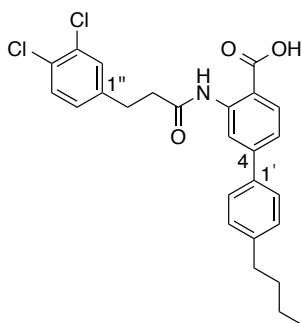


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.31 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.57 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.62 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 3.87 (s, 2H, CH₂CO), 7.31 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.43 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, H₅), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.68 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₃), 11.21 (s, 1H, NH), 13.26-13.78 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂), 21.8 (CH₃CH₂CH₂CH₂),

33.0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 34.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 42.9 (CH_2CO), 115.0 (C_1), 117.6 (C_3), 120.8 (C_5), 126.7 ($\text{C}_{2',6'}$), 129.1 ($\text{C}_{3',5'}$), 129.7 (C_4'), 130.3 (C_6''), 130.6 (C_5''), 130.9 (C_3''), 131.8 (C_6), 131.9 (C_2''), 135.9 (C_1'), 136.2 (C_1''), 141.2 (C_2), 143.0 (C_4'), 145.4 (C_4), 168.9 (CO_2H), 169.3 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): t_R = 4.32 min. **LC-MS (m/z)**: 456.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 455.1065 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 455.1055).

Ácido 2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-4-(4'-n-butilfenil)benzoico, (2.10)

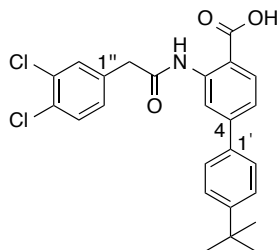
Preparado a partir del intermedio **2.56** (35.5 mg, 0.08 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (26.2 mg). Rdto. 89%.



¹H-NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 0.90 (t, J = 7.3 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.32 (sx, J = 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.57 (q, J = 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.63 (t, J = 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.79 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.96 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 7.29 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.33 (d, J = 8.3 Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.42 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1H, H_5), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 7.58 (d, J = 2.1 Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 8.03 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_6), 8.80 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H_3), 11.19 (s, 1H, NH), 13.46-13.70 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 13.8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 33.0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 34.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 38.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 114.9 (C_1), 117.6 (C_3), 120.6 (C_5), 126.7 ($\text{C}_{2',6'}$), 128.6 (C_4'), 128.9 (C_6''), 129.1 ($\text{C}_{3',5'}$), 130.4 (C_5''), 130.5 (C_2''), 130.8 (C_3''), 131.8 (C_6), 136.3 (C_1'), 141.2 (C_2), 142.1 (C_1''), 143.0 (C_4'), 145.4 (C_4), 169.3 (CO_2H), 170.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.90 min. **LC-MS (m/z)**: 470.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 469.12289 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 469.12115).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(4'-terbutilfenil)benzoico, (2.11)

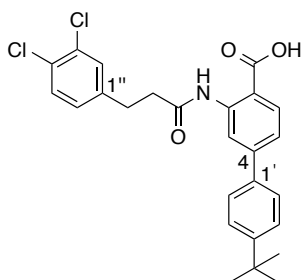
Preparado a partir del intermedio **2.57** (22mg, 0.05 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (19.8 mg). Rdto. 87%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃C), 3.87 (s, 2H, CH₂CO), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.44 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H₅), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.69 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₂), 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.55 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 11.24 (s, 1H, NH), 13.43-13.72 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 31.0 (CH₃)₃C, 34.4 (CH₃)₃C, 43.0 (CH₂CO), 115.2 (C₁), 117.6 (C₃), 120.9 (C₅), 125.9 (C_{2',6'}), 126.6 (C_{3',5'}), 129.7 (C_{4''}), 130.3 (C_{6''}), 130.6 (C_{5''}), 130.9 (C_{3''}), 131.8 (C₆), 131.9 (C_{2''}), 135.9 (C_{1'}), 136.0 (C_{1''}), 141.2 (C₂), 145.3 (C₄), 151.2 (C_{4'}), 168.9 (CO₂H), 169.2 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 8.06 min. **LC-MS (m/z)**: 456.3 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 455.1063 ([M]⁺ C₂₅H₂₃NO₃Cl₂ calculada 455.1055).

Ácido 2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-4-(4'-terbutilfenil)benzoico, (2.12)

Preparado a partir del intermedio **2.58** (21 mg, 0.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (17.5 mg). Rdto. 93%.

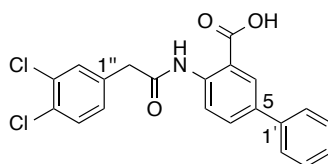


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.32 (s, 9H, (CH₃)₃C), 2.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 7.29 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H_{6''}), 7.43 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, H₅), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H,

$H_{5''}$), 7.57-7.62 (m, 3H, $H_{2'',2',6'}$), 8.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_6), 8.80 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_3), 11.22 (s, 1H, NH), 13.41-13.76 (bs, OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 31.1 (CH_3), 34.4 (CH_3), 38.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 115.0 (C_1), 117.6 (C_3), 120.7 (C_5), 126.0 ($C_{2',6'}$), 126.6 ($C_{3',5'}$), 128.6 ($C_{4''}$), 128.9 ($C_{6''}$), 130.4 ($C_{5''}$), 130.5 ($C_{2''}$), 130.8 ($C_{3''}$), 130.8 (C_6), 136.1 ($C_{1'}$), 141.2 (C_2), 142.2 ($C_{1''}$), 145.3 (C_4), 151.2 ($C_{4'}$), 169.3 (CO_2H), 170.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 8.68$ min. **LC-MS** (m/z): 470.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (EI^+) m/z encontrada 469.12019 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 469.12115).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-fenilbenzoico, (2.15)

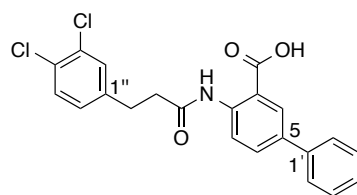
Preparado a partir del intermedio **2.59** (35 mg, 0.08 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (33.5 mg). Rdto. 98%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3.86 (s, 2H, CH_2CO), 7.34-7.42 (m, 2H, $H_{4',6''}$), 7.47 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $H_{3',5'}$), 7.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, $H_{5''}$), 7.64-7.71 (m, 3H, $H_{2',6',2''}$), 7.91 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H, H_4), 8.20 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H_6), 8.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_3), 11.14 (s, 1H, NH), 13.56-13.93 (bs, OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 42.9 (CH_2CO), 117.4 (C_1), 120.7 (C_3), 126.3 ($C_{2',6'}$), 127.6 ($C_{4'}$), 128.7 (C_6), 129.1 ($C_{3',5'}$), 129.7 ($C_{4''}$), 130.2 ($C_{6''}$), 130.6 ($C_{2''}$), 130.9 ($C_{3''}$), 131.8 ($C_{5''}$), 132.0 (C_4), 134.5 (C_5), 136.0 ($C_{1''}$), 138.6 ($C_{1'}$), 139.8 (C_2), 168.7 (CO_2H), 169.2 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 5.95$ min. **LC-MS** (m/z): 400.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (EI^+) m/z encontrada 399.0417 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 399.0429).

Ácido 2-[3-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-fenilbenzoico, (2.16)

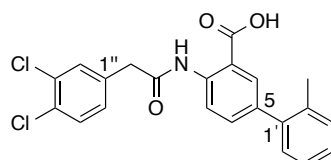
Preparado a partir del intermedio **2.60** (19 mg, 0.05 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (15.4 mg). Rdto. 99%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2.76 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 7.27 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.35 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7.45 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.56 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.64 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 7.88 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H, H_4), 8.19 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H_6), 8.52 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_3), 11.20 (s, 1H, NH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 30.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 117.9 (C_1), 121.4 (C_3), 127.0 ($\text{C}_{2',6'}$), 128.2 (C_4'), 129.3 (C_6), 129.4 ($\text{C}_{4''}$), 129.6 ($\text{C}_{6''}$), 129.7 ($\text{C}_{3',5'}$), 131.0 ($\text{C}_{5''}$), 131.2 ($\text{C}_{2''}$), 131.5 ($\text{C}_{3''}$), 132.7 (C_4), 134.9 (C_5), 139.4 ($\text{C}_{1'}$), 140.5 (C_2), 142.8 ($\text{C}_{1''}$), 170.0 (CO_2H), 170.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 6.45$ min. **LC-MS** (m/z): 414.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (EI^+) m/z encontrada 413.06018 ($[\text{M}]^+ \text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 413.05855).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-(2'-metilfenil)benzoico, (2.17)

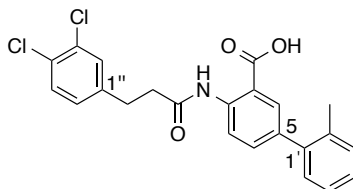
Preparado a partir del intermedio **2.61** (35 mg, 0.08 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (31 mg). Rdto. 91%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2.22 (s, 3H, CH_3), 3.86 (s, 2H, CH_2CO), 7.20 (m, 1H, $\text{H}_{6'}$), 7.22-7.32 (m, 3H, $\text{H}_{3',4',5'}$), 7.38 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.59 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, H_4), 7.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.69 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.86 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_6), 8.53 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_3), 11.12 (s, 1H, NH), 13.40-13.79 (bs, OH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 20.1 (CH_3), 42.9 (CH_2CO), 116.7 (C_1), 120.0 (C_3), 126.1 ($\text{C}_{5'}$), 127.6 ($\text{C}_{4'}$), 129.4 ($\text{C}_{6'}$), 129.7 ($\text{C}_{4''}$), 130.2 ($\text{C}_{6''}$), 130.5 ($\text{C}_{3'}$), 130.6 ($\text{C}_{5''}$), 131.0 (C_6), 131.2 ($\text{C}_{3''}$), 131.8 ($\text{C}_{2''}$), 134.5 (C_4), 134.7 (C_2), 135.6 (C_5), 136.0 ($\text{C}_{1''}$), 139.3 (C_2), 139.8 ($\text{C}_{1'}$), 168.7 (CO_2H), 169.2 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 6.66$ min. **LC-MS** (m/z): 414.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (EI^+) m/z encontrada 413.05998 ($[\text{M}]^+ \text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 413.05855).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-(2'-metilfenil)benzoico, (2.18)

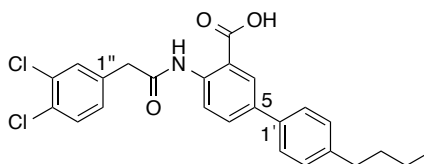
Preparado a partir del intermedio **2.62** (25 mg, 0.09 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (38.7 mg). Rdto. 66%.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.78 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 7.18-7.22 (m, 1H, H_{6'}), 7.24-7.32 (m, 4H, H_{3',4',5',6''}), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{5''}), 7.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.59 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H, H₄), 7.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₆), 8.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₅), 11.16 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.1 (CH₃), 29.5 (CH₂CH₂CO), 38.1 (CH₂CH₂CO), 116.7 (C₁), 120.0 (C₃), 126.1 (C_{5'}), 127.5 (C_{4'}), 128.6 (C_{4''}), 128.9 (C_{6''}), 129.4 (C_{6'}), 130.4 (C_{5''}), 130.4 (C_{3'}), 130.5 (C_{2''}), 130.8 (C₆), 131.1 (C_{3''}), 134.4 (C₄), 134.7 (C_{2'}), 135.3 (C₅), 139.4 (C₂), 139.8 (C_{1'}), 142.1 (C_{1''}), 169.3 (CO₂H), 170.2 (CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.80 min. **LC-MS (m/z)**: 428.2 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 427.0743 ([M]⁺ C₂₃H₁₉NO₃Cl₂ calculada 427.0742).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-(4'-n-butilfenil)benzoico, (2.23)

Preparado a partir del intermedio **2.63** (18 mg, 0.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (16.4 mg). Rdto. 92%.

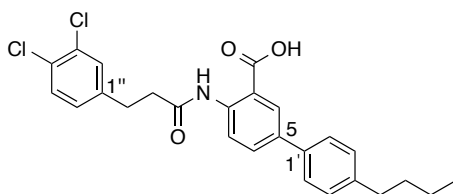


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.31 (sx, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.56 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 2.60 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 3.85 (s, 2H, CH₂CO), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.68 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 7.88 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, H₄), 8.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₆), 8.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₃), 11.10 (s, 1H, NH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-

d_6) δ (ppm): 13.8 ($\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.8 ($\text{CH}_3\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2$), 34.4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}$), 42.9 ($\underline{\text{CH}_2\text{CO}}$), 117.3 (C_1), 120.7 (C_3), 126.2 ($\text{C}_{2',6'}$), 128.5 (C_6), 129.0 ($\text{C}_{3',5'}$), 129.7 ($\text{C}_{4''}$), 130.2 ($\text{C}_{6''}$), 130.6 ($\text{C}_{5''}$), 131.0 ($\text{C}_{3''}$), 131.8 (C_4), 131.8 ($\text{C}_{2''}$), 131.9 (C_5), 134.5 (C_1'), 136.0 ($\text{C}_{1''}$), 139.5 (C_2), 141.8 (C_4'), 168.7 (CO_2H), 169.3 ($\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 80-95% de A en B, 10 min): t_R = 4.58 min. **LC-MS (m/z)**: 456.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 455.105 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 455.1055).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-(4'-n-butilfenil)benzoico, (2.24)

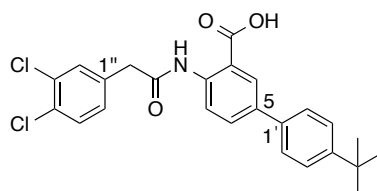
Preparado a partir del intermedio **2.64** (40 mg, 0.08 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (35.6 mg). Rdto. 91%.



¹H-NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 0.90 (t, J = 7.3 Hz, 3H, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.32 (sx, J = 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_3\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.57 (q, J = 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.69 (t, J = 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}$), 2.77 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{CO}}$), 2.95 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}}$), 7.25-7.31 (m, 3H, $\text{H}_{6'',3',5'}$), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 7.58 (d, J = 2.0 Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.88 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, H_4), 8.19 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H_6), 8.53 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H_3), 11.10 (s, 1H, NH), 13.55-13.98 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 13.8 ($\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.8 ($\text{CH}_3\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29.5 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}}$), 33.1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2$), 34.4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}$), 38.2 ($\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{CO}}$), 117.2 (C_1), 120.7 (C_3), 126.2 ($\text{C}_{2',6'}$), 128.5 (C_6), 128.6 ($\text{C}_{4''}$), 128.9 ($\text{C}_{6''}$), 129.0 ($\text{C}_{3',5'}$), 130.4 ($\text{C}_{5''}$), 130.5 ($\text{C}_{2''}$), 130.8 ($\text{C}_{3''}$), 131.8 (C_4), 134.2 (C_5), 136.1 (C_1'), 139.6 (C_2), 141.8 (C_4'), 142.2 ($\text{C}_{1''}$), 169.4 (CO_2H), 170.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.71 min. **LC-MS (m/z)**: 470.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS (EI⁺)** m/z encontrada 469.1226 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 469.1211).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-5-(4'-terbutilfenil)benzoico, (2.25)

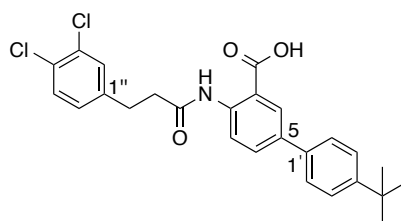
Preparado a partir del intermedio **2.65** (20 mg, 0.04 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (17.5 mg). Rdto. 96%.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.30 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 3.88 (s, 2H, CH_2CO), 7.38 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.47 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.58 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 7.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.68 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.88 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H, H_4), 8.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H_6), 8.53 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_3), 11.17 (s, 1H, NH), 13.46-13.95 (bs, OH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 31.0 (CH_3), 34.3 (CH_3), 42.9 (CH_2CO), 118.2 (C_1), 121.3 (C_3), 126.5 ($\text{C}_{2',6'}$), 126.7 ($\text{C}_{3',5'}$), 129.2 (C_6), 130.3 ($\text{C}_{4''}$), 130.9 ($\text{C}_{6''}$), 131.3 ($\text{C}_{5''}$), 131.6 ($\text{C}_{3''}$), 132.4 (C_4), 132.5 ($\text{C}_{2''}$), 135.0 (C_5), 136.5 ($\text{C}_{1'}$), 136.7 ($\text{C}_{1''}$), 140.2 (C_2), 150.0 ($\text{C}_{4'}$), 169.4 (CO_2H), 169.9 (CH_2CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): $t_R = 8.77$ min. **LC-MS (m/z)**: 456.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS (EI^+)** m/z encontrada 455.1049 ($[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ calculada 455.1055).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)propionilamino]-5-(4'-terbutilfenil)benzoico, (2.26)

Preparado a partir del intermedio **2.66** (35 mg, 0.08 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (32.1 mg). Rdto. 91%.

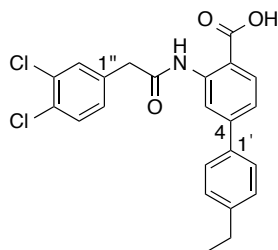


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.31 (s, 9H), 2.77 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 7.29 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{6''}$), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{5''}$), 7.56-7.60 (m, 3H, $\text{H}_{2',6',2''}$), 7.88 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, H_4), 8.19 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H_6), 8.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_3), 11.10 (s, 1H, NH), 13.56-1.98 (bs, OH). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 29.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 31.2 (CH_3), 34.4 (CH_3), 38.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 117.2 (C_1), 120.7 (C_3), 125.8 ($\text{C}_{2',6'}$), 126.0 ($\text{C}_{3',5'}$), 128.5 ($\text{C}_{6,4''}$), 128.9 ($\text{C}_{6''}$), 130.4 ($\text{C}_{5''}$), 130.5 ($\text{C}_{2''}$), 130.8 ($\text{C}_{3''}$), 131.9 (C_4), 134.2 (C_5), 135.9 ($\text{C}_{1'}$), 139.6 (C_2), 142.1 ($\text{C}_{1''}$), 150.0 ($\text{C}_{4'}$), 169.3 (CO_2H), 170.2

(CH₂CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 9.17 min. **LC-MS (m/z)**: 470.3 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺) m/z** encontrada 469.1201 ([M]⁺ C₂₆H₂₅NO₃Cl₂ calculada 469.1211).

Ácido 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-etinilbenzoico, (2.67)

Preparado a partir del intermedio 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(4'-etilfenil)benzoato de metilo (21 mg, 0.05 mmol) siguiendo el procedimiento general 2.2.3. Sólido amorfo blanco (18.3 mg). Rdto: 89%. El intermedio 2-[2-(3,4-diclorofenil)acetilamino]-4-(4'-etilfenil)benzoato de metilo fue preparado a partir del intermedio 2-amino-4-(4'-etilfenil)benzoato de metilo siguiendo el procedimiento general 2.2.2. (Rdto. 76%). El intermedio 2-amino-4-(4'-etilfenil)benzoato de metilo se preparó siguiendo el procedimiento general 2.2.1. (Rdto. 77%).



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.20 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃CH₂), 2.65 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₃CH₂), 3.87 (s, 2H, CH₂CO), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, H_{6''}), 7.43 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, H₅), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}), 7.68 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{2''}), 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆), 8.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₃), 11.23 (s, 1H, NH), 13.41-13.69 (bs, OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 15.5 (CH₃CH₂), 27.8 (CH₃CH₂), 42.9 (CH₂CO), 115.1 (C₁), 117.6 (C₃), 120.8 (C₅), 126.8 (C_{2',6'}), 128.6 (C_{3',5'}), 129.7 (C_{4''}), 130.3 (C_{6''}), 130.6 (C_{5''}), 130.9 (C_{3''}), 131.8 (C₆), 131.9 (C_{2''}), 135.9 (C_{1'}), 136.3 (C_{1''}), 141.2 (C₂), 144.4 (C_{4'}), 145.4 (C₄), 168.9 (CO₂H), 169.3 (CH₂CO). **HPLC** (Sunfire C18, gradiente 50-95% de A en B, 10 min): t_R = 7.92 min. **LC-MS (m/z)**: 428.1 ([M+H]⁺). **HRMS (EI⁺) m/z** encontrada 427.0744 ([M]⁺ C₂₃H₁₉NO₃Cl₂ calculada 427.0742).

3. Métodos computacionales

3.1. Modelado por homología de DREAM humana

Para la construcción de los modelos por homología se utilizó el programa de predicción de estructura de proteínas Prime (Prime, v3.0, Schrodinger, LLC, New York, NY) y los parámetros por defecto. Como patrones, se utilizaron las estructuras de RMN de ratón (código pdb 2JUL) y de rayos X KChIP1 humana (códigos pdb 1S1E y 2I2R). Las proteínas patrones se prepararon usando la aplicación Protein Preparation Wizard accesible a través de Maestro 9.2 (Schrödinger Inc).

3.2. Estudios de *docking*

Los ligandos se prepararon con el módulo Ligprep Wizard accesible a través de Maestro 9.2 (Schrödinger Inc), utilizando el campo de fuerzas OPLS_2005.

La búsqueda de los sitios de unión en el modelo hDREAM se realizó con el módulo SiteMap del paquete de programas Schrödinger, utilizando los parámetros por defecto.

El docking molecular se realizó con el protocolo de Induced Fit Docking basado en Glide 5.7 y Prime 3.0, e implementado en el paquete de programas Schrödinger. Para estos estudios se partió del modelo de hDREAM generado a partir de 2I2R. Inicialmente se realiza el docking de cada ligando atenuando el potencial de interacción de van der Waals, el escalado de vdW fue de 0.5 Å para el receptor y el ligando. A continuación, para cada pose obtenida (como máximo 20 por ligando) se optimizan la disposición de las cadenas laterales de los residuos de hDREAM hasta una distancia de 5 Å del ligando, para lo que se utilizó Prime, seguido de una minimización de este grupo de residuos y del ligando para cada complejo hDREAM-ligando. Los complejos obtenidos cuya energía no difiera en más de 30 kcal/mol del de menor energía se seleccionan para un redocking con Glide, utilizando los parámetros por defecto de Glide.

4. Ensayos biológicos

4.1. Determinación de las interacciones moleculares por SPR

La capacidad de interacción de los compuestos sintetizados se realizó mediante la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un equipo Biacore X100,

siguiendo el protocolo que se detalla a continuación. La inmovilización covalente de GST-DREAM se realizó en un chip tipo CM5 mediante la formación de un enlace amida entre los grupos carboxílicos de la matriz de dextrano y los grupos amino de la proteína. GST-DREAM se diluyó en una disolución tampón de acetato sódico a pH 4 hasta una concentración de 100 µg/ml. Los grupos carboxílicos de la matriz se activaron por la inyección de una solución 0.2 M de N-etil-N-dimetilaminopropilcarbodiimida (EDC) y 50 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) durante 7 min. GST-DREAM se inyectó durante 7 minutos sobre el canal 2 para posteriormente inyectar etanolamina 1 M a pH 8.5 otros 7 minutos y bloquear así el exceso de grupos reactivos. El nivel de inmovilización final fue 8000-10000 RU (unidades de resonancia). Como referencia se utilizó el canal 1 previamente activado y bloqueado pero sin proteína unida. Posteriormente se equilibró el chip mediante lavados sucesivos con el tampón del experimento: Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM con 2% de DMSO y 0,05% de Tween X100. Los compuestos a evaluar fueron inyectados durante 1 min a un flujo de 90 µl/min (GST-DREAM inmovilizada y canal de referencia). Cada ciclo de medida consistió en un período de espera de 1 min para vigilar la estabilidad de línea de base, 1 min de inyección del compuesto, 1 min de disociación, y un lavado del sistema con una mezcla 1:1 de DMSO para posteriormente volver a equilibrar con la disolución tampón de Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM con 2% de DMSO y 0,05% de Tween X100.

4.2. Definición del sitio de unión por mutagénesis dirigida

Las mutaciones sobre el ADN clonado de DREAM, se llevaron a cabo *in vitro* empleando el método Quick Change (Stratagene). Las proteínas de fusión a GST-DREAM recombinante o DREAM mutado fueron purificadas por cromatografía de afinidad. La pureza fue medida a través de electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior tinción con plata.

4.3. Estudio de la modulación de K_v4.3/DREAM

4.3.1. Cultivos celulares

El efecto de los compuestos sobre la corriente I_{SA} se midió mediante la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana "Patch-clamp" en la configuración de célula entera con un amplificador de patch-clamp Axopatch 200B (Molecular Devices). Los experimentos presentados en esta Memoria se realizaron utilizando células CHO transfectadas transitoriamente con el ADNc que codifica para los canales de potasio

Kv4.3 solos o con el cDNA de la subunidad moduladora DREAM. La línea celular CHO proviene de ovario de hámster chino (Chinese hamster ovary). Por un lado, estas células presentan canales de Na⁺ endógenos, pero la amplitud de estas corrientes es muy pequeña para interferir en la corriente de potasio objeto de estudio. Esta línea celular representa un buen modelo para el estudio de canales K_v, ya que no expresan ningún otro tipo de K_v como las células HEK293. Las células se cultivaron a 37°C en medio Iscove suplementado con suero bovino fetal al 10%, 1% de L glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina en 5% de CO₂. Las células crecieron en placas de 35 mm de diámetro mantenidas en un incubador a 37° C bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %. Se levantaron cada semana empleando 0.5 ml de una solución con proteasas TrypLETM Express (Life Technologies). Pasado 1 min se añadió 1 ml de medio. Las células se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 327 x g durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, se homogeneizó el sedimento de células en medio y se sembraron volúmenes variables en placas de cultivo para su posterior transfección.

4.3.2. Expresión de los canales iónicos

Las células CHO fueron cotransfectadas con el cDNA codificante de la expresión de canales Kv4.3 y CD8 ó Kv4.3/DREAM y CD8. En ambos casos, el cDNA codificante del antígeno de superficie CD8 fue utilizado como gen marcador. El cDNA codificante para los canales KV4.3 clonados en el vector de expresión pEGFPn1 fue proporcionado por el Dr. D.J. Snyders de la Universidad de Amberes (Bélgica). El cDNA codificante para la subunidad moduladora DREAM clonado en el vector de expresión pcDNA3.1 fue proporcionado por el Dr. J.R. Naranjo (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, España). Finalmente, el vector EBO-pcDLeu2 contiene el cDNA que codifica la expresión del antígeno de superficie CD8 y se utiliza como marcador de las células que se han transfectado. Las células que han incorporado este vector expresan la proteína CD8 en su membrana y, en su mayoría, serán las que se a su vez expresen los canales transfectados.

4.3.3. Transfección en células CHO

La transfección del cDNA codificante para los canales Kv4.3 y Kv4.3/DREAM se realizó utilizando Fugene-6 (Promega) de acuerdo con el protocolo estándar recomendado por el fabricante. Fugene-6 es una mezcla no liposómica diseñada para transfectar plásmidos de cDNA en una gran variedad de líneas celulares con alta eficiencia y baja toxicidad. Se emplearon 7.5 µl de Fugene-6 (una relación 3:1, respecto

a la cantidad total de cDNA en μg que deseamos transfectar), 0.5 μg del vector que contiene el cDNA de Kv4.3, 1.5 μg de DREAM y 0.5 μg del plásmido marcador EBO-pcDLeu2.

La mezcla de transfección se preparó en medio sin suero y sin antibióticos, y posteriormente se incubó durante 30-45 min. Tras este periodo, la mezcla de transfección se añadió al cultivo de células con un 60 % de confluencia. Al cabo de 48 h, las células se incubaron durante 5 min con microesferas de poliestireno que llevan unidas el anticuerpo anti-CD8 (Dynabeads M-450, Dynal, Invitrogen Co.) para su posterior selección (53-56). Las células se levantaron, tras eliminar las Dynabeads no unidas a las células y se añadieron, posteriormente, 0.5 ml de una solución con proteasas TrypLETM Express (Life Technologies). Pasado 1 min se añadió 1 ml de medio. Las células se transfirieron a un tubo de 15 ml para su centrifugación a $327 \times g$ durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, se homogeneizó el sedimento de células con medio. Tras 30-60 min a temperatura ambiente ($22\text{-}25^\circ\text{C}$), se iniciaron los experimentos de electrofisiología, que se realizaron durante las 12 h posteriores.

4.3.4. Registro de las corrientes

El registro de la corriente se realizó en situación control (Kv4.3 o Kv4.3/DREAM) y posteriormente en presencia de compuesto (Kv4.3+compuesto, Kv4.3/DREAM+compuesto). Las corrientes se filtraron a 2 kHz (cuatro polos del filtro de Bessel) y la muestra a 4 kHz. Las micropipetas fueron obtenidas de tubos capilares de vidrio de borosilicato (Narishige GD-1) en un extractor horizontal programable (Sutter Instrument Co.) y pulidas con un microforge (Narishige). La resistencia de la micropipeta fue de 1.8 a 3 $\text{M}\Omega$. La capacitancia y compensación de la resistencia fueron optimizados con un 80% de compensación efectivo. La solución de llenado de la pipeta intracelular estaba formada por una solución 80 mM de aspartato de potasio, 42 mM de KCl, 3 mM de fosfocreatina, 10 mM de KH_2PO_4 , 3 mM de MgATP, 5 mM de HEPES-K, 5 mM de EGTA y se ajustó a pH 7.25 con KOH. La solución del baño estaba compuesta por un medio que contenía NaCl 136 mM, KCl 4 mM, CaCl_2 1.8 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES-Na 10 mM y glucosa 10 mM y se ajustó a pH 7.40 con NaOH.

Para analizar los efectos producidos por los compuestos sintetizados sobre la corriente Kv4.3 y el complejo Kv4.3/DREAM, se utilizó un protocolo experimental que consistió en la aplicación de pulsos despolarizantes de 250 ms desde un potencial de fijación de -80 hasta +60 mV cada 30 s, repolarizando a -40 mV durante otros 250 ms, para obtener las corrientes de cierre.

4.4. Estudio de la modulación de ATF6/DREAM

4.4.1. Ensayo reportero de Luciferasa

Las células de neuroblastoma N2A (4×10^5 células/p60 mm placa) se incubaron durante 3 h (JetPEI, Polyplus Transfections)) y a continuación se transfectaron con 0.5 μ g del plásmido reportero p5xATF6-GL3 (Addgene) y 2.5 μ g de ADNc que codifica DREAM salvaje por placa. Tras 20h de la transfección, las células se expusieron al compuesto o a DMSO durante 1h antes de la estimulación con tunicamicina, y se recogieron 14h más tarde. Para la cuantificación relativa de la actividad de luciferasa, las células fueron lisadas 72h después de la transfección y las medidas se realizaron en un luminómetro de la marca Turner Biosystems. En todos los experimentos de transfección se incluyó la cuantificación de luciferasa de renilla que sirvió para normalizar los ensayos de transfección.

4.4.2. Experimentos de captura “Pull-down”

Cantidades equimolares de las proteínas recombinantes GST y GST-DREAM (aa 1–256) se unieron a bolas de sefarosa glutatión (GEH) utilizando como disolución de unión (PBS, 5 mM DTT, 1 mM EDTA e inhibidores de proteasa libre Mini EDTA [Roche]) durante 2 h a 4°C. Tras un lavado intenso con la disolución de unión, las bolas se bloquearon con un 5% de BSA durante toda la noche, se lavaron de nuevo con disolución de unión y se reconstituyeron con la disolución de ensayo (20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% NP₄₀, 5 mM DTT, inhibidores de proteasa libre Mini EDTA [Roche] con 2 mM CaCl₂ o MgCl₂ o EGTA). A continuación, se añadió el extremo Nt-ATF6 (aa 1–376) translocado *in vitro* (TNT Quick Coupled Transcription/Translation, Promega) a las bolas, así como los compuestos (200 nM) y se incubó durante 1h a 4°C. Tras lavados intensos con la disolución de ensayo, las proteínas fueron desancladas de la resina con disolución 2×SDS y se realizó una electrotransferencia en gel de poliacrilamida (Western blot) utilizando un anticuerpo policlonal de ATF6 (H-280, Santa Cruz Biotechnology Inc.)

4.4.3. Ensayo de coordinación motora en Rota-Rod

El ensayo de rotarod se utilizó para medir la coordinación motora y el equilibrio (Accelerating Model, Ugo Basile, Biological Research Apparatus). Los ratones de los genotipos salvaje (WT) y R6/1 se sometieron a dos sesiones previas de toma de contacto con el equipo y aprendizaje el día anterior al experimento. El primer día, cada

ratón completó dos veces un tiempo de 60 segundos a una velocidad constante de 4 rpm con un periodo de descanso de 60 segundos. El día del experimento, la velocidad de giro fue creciente haciendo una rampa de 4 a 40 rpm en 60 segundos. Cada ratón realiza el experimento 4 veces. Entre ensayo y ensayo se permite un tiempo de descanso de 60 segundos. La caída del ratón de la plataforma giratoria corta automáticamente el cronometraje del tiempo y establece la variable tiempo de latencia que se usa como registro para cada animal. Normalmente, los ensayos de coordinación motora se realizaron a distintos tiempos para medir la progresividad del deterioro motor en los ratones R6/1, en este caso a las 12 y 20 semanas.. Se hace la media de los datos de los 4 experimentos y se realiza análisis estadístico para obtener el dato de tiempo de latencia.

4.4.4. Ensayo de memoria: test de reconocimiento de objeto nuevo

El test de reconocimiento de objeto nuevo que consiste en la exposición de los ratones ante objetos nuevos y ya explorados para evaluar su capacidad de discriminación ante los mismos. Este Test se realiza durante 3 días consecutivos. En 1 primer día, denominada también fase de familiarización, los ratones se colocan ante dos objetos idénticos (T_a y T_a) durante 5 minutos. En el segundo día se evalúa su memoria a corto plazo. Para ello, en primer lugar se coloca a los ratones frente a los mismos objetos del día anterior durante el mismo tiempo. A las 4 horas, se sustituye uno de los objetos por uno nuevo (T_c). De esta manera, cada ratón volverá a evaluarse durante 5 minutos anotándose el tiempo que exploran el objeto nuevo (T_c) y el objeto ya explorado (T_a). Los ratones que no muestren interés en los objetos y no los exploran por al menos 2 segundos son excluidos del ensayo. Tras registrar los tiempos de exploración a uno y otro objeto se calcula el Índice de Discriminación (D.I.) de acuerdo con la fórmula:

$$D.I. = (T_c - T_a) / (T_c + T_a)$$

El tercer día se evalúa la memoria a largo plazo (24 h). Para este fin, se coloca un objeto ya explorado (T_a) y otro nuevo (T_n). A continuación se cronometra el tiempo de exploración durante 5 minutos y se calcula el D.I. Como en el ensayo de memoria a corto plazo, se excluyen aquellos ratones cuyo tiempo total de exploración no supera los 2 segundos.

ANEXOS

Anexo 1: Características electrofisiológicas de los canales $K_v4.3$

Las células nerviosas o musculares son células excitables con propiedades eléctricas complejas que les permite llevar a cabo procesos tan diversos que van desde la contracción muscular hasta el aprendizaje. Para poder realizar estas funciones, generan impulsos eléctricos en respuesta a diferentes estímulos mediante el intercambio de iones entre el medio intra y extracelular. Este transporte de iones a través de la membrana requiere de sistemas de transporte especializados como son los canales iónicos o las proteínas transportadoras.¹

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que controlan la permeabilidad de los iones mediante la transición entre distintos estados conformacionales. Estos canales tienen la característica de ser selectivos para diferentes iones, como sodio (Na^+), potasio (K^+), cloro (Cl^-) y calcio (Ca^{2+}).² Entre los distintos estados que puede adoptar un canal iónico se encuentra un estado abierto y dos no conductores denominados cerrado e inactivo. En condiciones basales, los canales iónicos se encuentran cerrados y una vez que el canal ha sido activado, se produce la apertura del poro, realizándose la conducción de iones a favor del gradiente electroquímico.³ Dependiendo del estímulo que de lugar al tránsito entre los diferentes estados se habla de canales dependientes de voltaje (el proceso de apertura y cierre depende del voltaje de reposo), activados por ligando (depende de la unión de hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (proceso regulado por el Ca^{2+} u otros factores intracelulares).⁴

Cuando un canal se abre, se produce un movimiento neto de cargas que da lugar a una corriente eléctrica.⁵ La medición de esta corriente eléctrica, permite estudiar las características electrofisiológicas (activación, inactivación y recuperación de la inactivación) de cada uno de los distintos tipos de canales iónicos activados por voltaje. De una manera sencilla, en un modelo de dos compuertas, la activación es el proceso de apertura de la compuerta de activación que ocurre cuando el voltaje dentro de la membrana (potencial de membrana) se vuelve más positivo (despolarización) lo que permitirá registrar un aumento de corriente con respecto a la corriente registrada en el estado cerrado. La inactivación es el cierre de la compuerta de inactivación y al igual que en la activación ocurre a potenciales despolarizantes. La recuperación de la inactivación o re-movilización de la carga es la apertura de la compuerta de inactivación, es decir, el proceso inverso a la inactivación.⁶

1. Mediciones de la corriente a través de los canales iónicos activados por voltaje Kv. *Patch clamp*

La técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (*patch clamp*),⁷ consiste en formar parches en la membrana de una célula de manera que se pueden estudiar los canales que quedan "atrapados". Para ello, se fabrica una pipeta microscópica que se llena de una solución salina apropiada para la corriente que se desea estudiar. El interior de la pipeta, contiene un electrodo que se conecta a un amplificador de tierra. Cuando la punta de la pipeta se acerca a la membrana de una célula se hace una succión con un sistema de vacío acoplado a la pipeta lo que permite romper la membrana de forma que la célula queda adosada a la pipeta. Esta configuración se denomina célula entera o "*whole-cell*" (Figura 1). Mediante el contacto célula-pipeta se establece un circuito eléctrico que permite medir la actividad eléctrica de los canales iónicos en una célula viva. Así, una vez que los canales quedan atrapados en el parche, se observará una variación de la corriente en el tiempo a un potencial que es fijado previamente, es decir, las fluctuaciones entre los distintos estados abierto, cerrado e inactivo.⁸

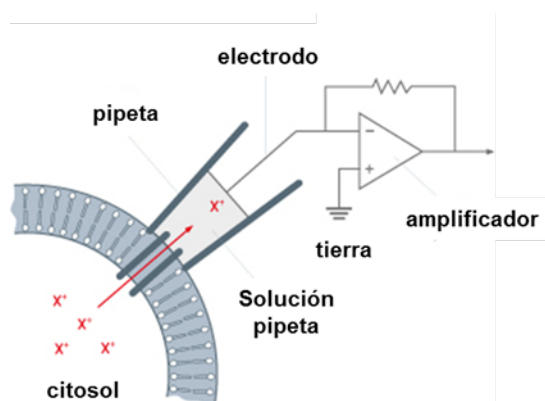


Figura 1. Representación de la técnica *patch clamp* en su configuración de parche sobre célula entera

La obtención de registros eléctricos a distintos potenciales permite establecer la relación corriente-voltaje (I-V) y ciertas características del canal como es su conductancia (G_{Kv}). Así, la representación de la amplitud de la corriente medida en el pico máximo tras aplicar un protocolo a distintos pulsos da lugar a la relación corriente-voltaje (I-V). Para obtener información acerca de G_{Kv} , se grafica la relación I-V. Dado que según la ley de Ohm:

$$V = r I; \text{ y que}$$

$G = 1/r$; se deduce que

$G = I/(E_m - E_{rev})$, donde I es la intensidad máxima registrada, E_m el potencial de membrana y E_{rev} el potencial de reversión o de equilibrio. El potencial de reversión es específico de cada canal y se define como el potencial al cuál el flujo neto de carga es cero. A partir de los valores de conductancia del canal se pueden obtener las curvas de activación e inactivación mediante la representación de G (pA) frente al potencial del pulso despolarizante. Si se ajusta a la ecuación de Boltzman

$Y = 1/(1 + \exp((E - E_h)/s))$, donde E es el potencial de membrana, E_h el voltaje al cual el 50% de los canales están activados o inactivados, y s es la pendiente de la curva de activación o inactivación, se obtienen las curvas deseadas.⁹ Si se ajustan los trazos de corriente obtenidos al aplicar pulsos despolarizantes a una ecuación monoexponencial o biexponencial del tipo $y = \sum A e^{-(t/(\tau))^x} + C$, donde A es la amplitud de cada componente exponencial y C es el valor basal, se pueden obtener las constantes de tiempo τ de la activación e inactivación.

Las velocidades de la recuperación de la inactivación dependen de cada tipo de canal dependiendo de voltaje siguiendo generalmente una evolución monoexponencial o biexponencial. De la misma manera que en la activación e inactivación, el ajuste a una ecuación exponencial permite conocer el curso temporal del proceso de recuperación de la inactivación de los canales dependientes de voltaje objeto de estudio.

Si lo que se desea saber es la carga que pasa por un canal durante un tiempo dado, basta con determinar el área bajo la curva de cada uno de los registros obtenidos a distintos potenciales.

Para evaluar la dependencia de concentración de un fármaco, se calcula la fracción de bloqueo en situación control (sin fármaco) y en presencia de compuesto comparando la amplitud máxima de corriente en cada pulso a +60 mV mediante la ecuación $f = 1 - (I_{\text{fármaco}}/I_{\text{control}})$. Así, el empleo de la ecuación de Hill ($f = 1 / [1 + (CI_{50} / [F]^{nH})]$, donde $[F]$ es la concentración de fármaco utilizada y nH es el coeficiente de Hill) permite determinar la concentración de fármaco para la cual el 50% de los canales están bloqueados (CI_{50}).¹⁰

2. Características cinéticas de los canales dependientes de voltaje Kv4.3 y del complejo Kv4.3/DREAM

Los canales de potasio activados por voltaje Kv son los responsables del flujo de iones K⁺ a través de la membrana plasmática en respuesta a un cambio de potencial. En condiciones de reposo, el voltaje intracelular es negativo (-80 mV) de manera que los canales Kv de una célula excitable estarán mayoritariamente cerrados. En la Figura 2 se muestran los registros de corriente y los distintos estados conformacionales para el caso particular del canal de potasio activado por voltaje Kv4.3. Cuando se produce una despolarización de la membrana a valores más positivos (de -80 a +60 mV), estos canales se activarán de forma que la probabilidad de encontrar un canal abierto aumentará. Si lo que se produce es una despolarización larga (al final del pulso, 250 ms), se darán una serie de cambios conformacionales en el canal de manera que muchos de ellos pasarán a un estado inactivo no conductor. Desde este estado inactivo, el canal pasará rápidamente a un estado cerrado mediante la repolarización de la membrana es decir, cuando se vuelve a potenciales de reposo (-80 mV).¹¹

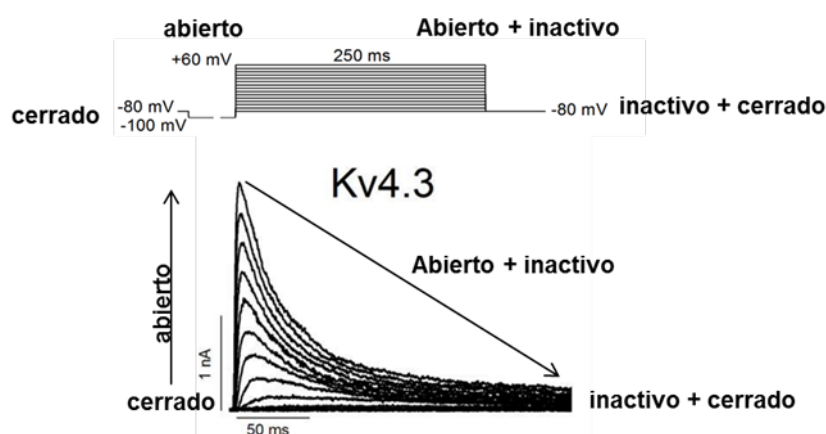


Figura 2. Registros de la corriente generada tras la aplicación de un protocolo de doble pulso con un pulso inicial de 250 ms de duración a -100 mV, seguido de 15 pulsos de 250 ms de duración desde -80 a +60 mV en incrementos de 10 mV.

Aunque la expresión de las subunidades que conforman los canales de potasio Kv es suficiente para que sean funcionales, sus características nativas solo son reproducibles cuando se coexpresan con alguna subunidad auxiliar o accesoria. El ensamblaje de estas subunidades modifica la expresión, la apertura y cierre del canal y por tanto, modifica las características electrofisiológicas del mismo. En el caso particular de Kv4.3, estos canales son regulados por las subunidades KChIPs entre otras. En esta Memoria nos centramos en el complejo que forma Kv4.3 con la

subunidad reguladora KChIP3/DREAM/calsenilina. La formación de dicho complejo hace que se facilite el tráfico del canal a la membrana y como consecuencia, que aumente la expresión en esta región. Además, DREAM también modifica la apertura y cierre del canal, ralentizando su inactivación y acelerando la recuperación de la inactivación. En la Figura 3, se muestran las relaciones I-V (Figura 3.A), las curvas de activación e inactivación (Figura 3.B) y la cinética de recuperación (Figura 3.C) de los canales Kv4.3 y del complejo Kv4.3/DREAM.¹²

De las relaciones I-V (Figura 3.A) se puede deducir que para los canales Kv4.3, la aplicación de pulsos más positivos de -40 mV da lugar a una activación con una cinética rápida de salida de K⁺ de manera, que cuanto más despolarizante es el pulso aplicado, mayor es la magnitud de la corriente activada. La presencia de DREAM como subunidad reguladora, hace que se acelere la activación (mayor pendiente) de la corriente a todos los potenciales aplicados desde -40 mV.

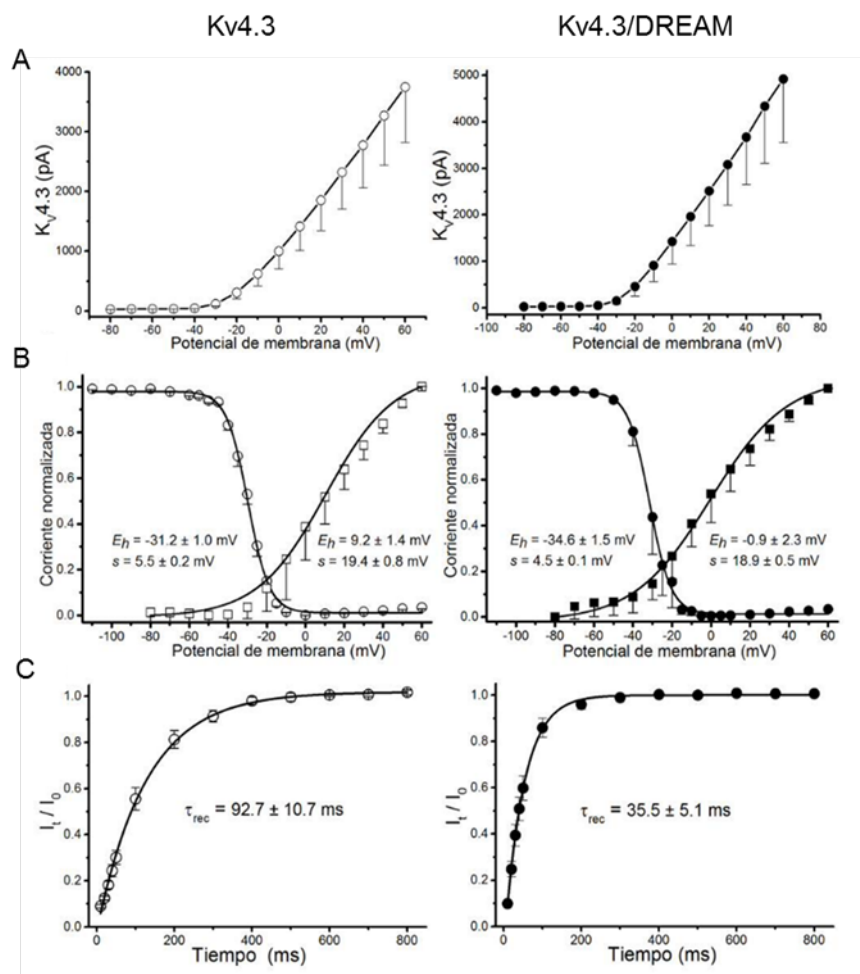


Figura 3. A: Relación I-V. B: Curvas de activación e inactivación. C: Cinética de recuperación de la inactivación. En todos los casos se muestra la situación con el canal aislado y en forma de complejo Kv4.3/DREAM.

En la Figura 3.B se muestra la cinética de inactivación y activación para los canales Kv4.3 y el complejo Kv4.3/DREAM. En ambos casos, se recogen los valores de E_h y s de cada una de las curvas de activación e inactivación. Quizás el cambio más llamativo se da en la curva de activación donde $E_h = 9.2 \pm 1.4$ mV para Kv4.3 y $E_h = -0.9 \pm 2.3$ mV para Kv4.3/DREAM. Si se ajusta el proceso de inactivación a una biexponencial tipo $y = A_1 e^{-t/(\tau_f)} + A_2 e^{-t/(\tau_s)} + C$, donde A_1 y A_2 son las amplitudes de cada componente exponencial y C es el valor basal, se pueden obtener unas constantes de tiempo de inactivación rápida y lenta (τ_f y τ_s , respectivamente) de 22.9 ± 2.1 ms y 78.2 ± 6.5 ms para Kv4.3, y 20.5 ± 1.2 ms y 73.2 ± 3.1 ms respectivamente para Kv4.3/DREAM. Estos valores indican que DREAM enlentece la cinética de inactivación de los canales Kv4.3 sin ensamblar.

En cuanto a la cinética de recuperación (Figura 3.C), los valores obtenidos de la constante del tiempo de recuperación (τ_{rec}) cuando se realiza un ajuste monoexponencial empleando una ecuación tipo $y = A_1 e^{-t/(\tau_{rec})} + C$ son de 92.7 ± 10.7 ms para Kv4.3 y de 35.5 ± 5.1 ms para Kv4.3/DREAM, lo que indica que DREAM acelera la recuperación de los canales Kv4.3 sin ensamblar.

Bibliografía

1. Aidley, D. J. The physiology of excitable cells. London: Cambridge University Press. **1983**.
2. Roux, B.; Berneche, S.; Egwolf, B.; Lev, B.; Noskov, S. Y.; Rowley, C. N.; Yu, H. Ion selectivity in channels and transporters. *J. Gen. Physiol.* **2011**, 137, 415-426.
3. (a) Dolly, J. O.; Parcej, D. N. Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1996**, 28, 231-253; (b) Latorre, R. Molecular origin of ion selectivity and gating in voltage-dependent ion channels. *Cienc. Cult.* **1998**, 50, 196-207; (c) Moreau, A.; Gosselin-Badaroudine, P.; Chahine, M. Molecular biology and biophysical properties of ion channel gating pores. *Q. Rev. Biophys.* **2014**, 47, 364-388.
4. Alexander, S. P. H.; Mathie, A.; Peters, J. A. Ion channels. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 158, S123-S155.
5. Armsgrong, C. M.; Bezanilla, F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* **1973**, 242, 459-61.
6. (a) Olcese, R.; Latorre, R.; Toro, L.; Bezanilla, F.; Stefani, E. Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **1997**, 110, 579-589; (b) Kuzmenkin, A.; Bezanilla, F.; Correa, A. M. Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: Voltage-dependent charge movement and gating currents. *J. Gen. Physiol.* **2004**, 124, 349-356; (c) Maennikkoe, R.; Pandey, S.; Larsson, H. P.; Elinder, F. Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels: Conversion between two modes affects pacemaker properties. *J. Gen. Physiol.* **2005**, 125,

- 305-326; (d) Piper, D. R.; Varghese, A.; Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M. Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 10534-10539; (e) Shirokov, R.; Levis, R.; Shirokova, N.; Rios, E. Two classes of gating current from L-type Ca channels in guinea pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **1992**, *99*, 863-95.
7. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **1981**, *391*, 85-100.
8. Ogden, D.; Stanfield, P (1994). In *''Microelectrode Techniques: The plymouth Workshop handbook''*. P 53. Company of biologists Ltd. Cambridge, UK.
9. Ypey, D. L.; De Felice, L. J. The patch-clamp technique explained and exercised with the use of simple electrical equivalent circuits.
10. (a) Macias, A.; de, I. C. A.; Prieto, A.; Peraza, D. A.; Tamkun, M. M.; Gonzalez, T.; Valenzuela, C. PKC inhibition results in a Kv 1.5 + Kv β 1.3 pharmacology closer to Kv 1.5 channels. *Br J Pharmacol* **2014**, *171*, 4914-26; (b) Franqueza, L.; Longobardo, M.; Vicente, J.; Delpon, E.; Tamkun, M. M.; Tamargo, J.; Snyders, D. J.; Valenzuela, C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ. Res.* **1997**, *81*, 1053-1064; (c) Arias, C.; Guizy, M.; David, M.; Marzian, S.; Gonzalez, T.; Decher, N.; Valenzuela, C. Kv β 1.3 Reduces the Degree of Stereoselective Bupivacaine Block of Kv1.5 Channels. *Anesthesiology* **2007**, *107*, 641-651.
11. (a) An Introduction to Cardiac Electrophysiology Antonio Zaza, Michael Rosen, 2000; (b) Wang, S.; Bondarenko, V. E.; Qu, Y.; Morales, M. J.; Rasmusson, R. L.; Strauss, H. C. Activation properties of Kv4.3 channels: Time, voltage and [K⁺]_o dependence. *J. Physiol. (Oxford, U. K.)* **2004**, *557*, 705-717; (c) Wang, S.; Patel, S. P.; Qu, Y.; Hua, P.; Strauss, H. C.; Morales, M. J. Kinetic properties of Kv4.3 and their modulation by KChIP2b. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *295*, 223-229.
12. (a) Pérez, D. A. P. Efectos electrofisiológicos de pc332 y pc342 sobre los canales KV4.3 Y KV4.3+KChIP3. *Máster en investigación farmacológica*. **2015**; (b) Naranjo, J. R.; Zhang, H.; Villar, D.; Gonzalez, P.; Dopazo, X. M.; Moron-Oset, J.; Higuera, E.; Oliveros, J. C.; Arrabal, M. D.; Prieto, A.; Cercos, P.; Gonzalez, T.; De, I. C. A.; Casado-Vela, J.; Rabano, A.; Valenzuela, C.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Li, J.-Y.; Mellstrom, B. Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 627-38.

Anexo 2: Resonancia de Plasmón de (SPR)

La Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) es una técnica analítica que permite monitorizar con gran sensibilidad interacciones moleculares en tiempo real, proporcionando información de especificidad, cinética y/o afinidad. Estos cambios en la superficie son detectados en una interfase a través del registro de las condiciones de excitación de los plasmones de superficie.

1. Fenómeno de resonancia de plasmón de superficie

De forma general, la resonancia de plasmón de superficie es un fenómeno que ocurre cuando un haz de luz monocromática y plano-polarizada incide sobre una placa metálica que separa dos medios produciéndose una reflexión de parte de la luz incidente y una propagación de la misma por el metal. En esta situación, se genera una onda evanescente que interactúa con los electrones de conducción del metal (plasmones) produciéndose una pérdida de energía de la luz incidente y por tanto, una disminución de la intensidad de luz reflejada.¹ Todo este proceso que tiene lugar a un ángulo de incidencia determinado (ángulo de resonancia) es dependiente del índice de refracción de los medios cercanos a la placa metálica, normalmente vidrio y una disolución acuosa. Debido a que la longitud de onda de la luz incidente, el índice de refracción del metal y del vidrio son constantes, el ángulo de resonancia sólo variará con los cambios en el índice de refracción de la fase acuosa. En un experimento típico de SPR, la fase acuosa contiene una molécula complementaria que es reconocida por un material biológico inmovilizado sobre la superficie de un chip sensor. Por tanto, los cambios en el índice de refracción serán dependientes de las variaciones en la masa que tienen lugar cuando la molécula complementaria interacciona con la biomolécula inmovilizada.

Existen varias formas de excitación de plasmones para conseguir la condición de resonancia. Entre ellas, cabe destacar el empleo de prismas de acoplamiento o redes de difracción. Cuando lo que se usa es un prisma de acoplamiento, a la distribución resultante se le denomina configuración de Kretschmann² y constituye el método más estandarizado de excitación óptica empleado hoy en día (Figura 1).

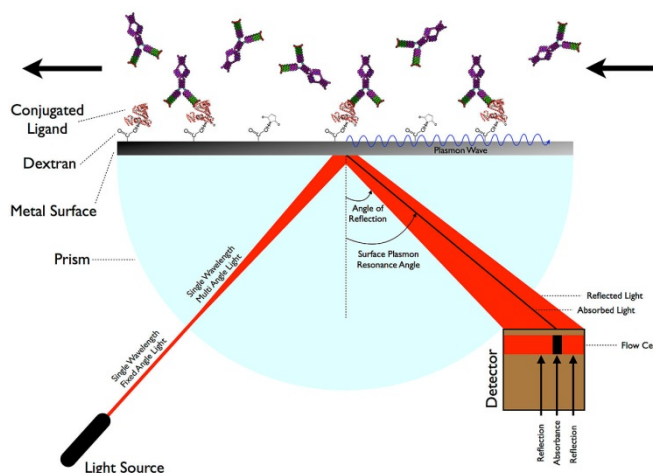


Figura 1. Diagrama esquemático del fenómeno de resonancia de plasmón de superficie basado en la configuración de Kretschmann

2. Dispositivo de SPR

El dispositivo de SPR es un biosensor de pequeño tamaño formado por un material biológico de reconocimiento (anticuerpo, proteína, ADN...) inmovilizado sobre la superficie de un chip sensor en contacto con un sistema transductor que convierte la interacción del elemento biológico con la molécula complementaria en una señal cuantificable. En la configuración de Kretschmann, la superficie transductora está formada por una capa fina de oro depositada directamente sobre la cara plana de un prisma de cristal o sobre un portaobjetos de vidrio acoplado al prisma. Además de la superficie transductora, un dispositivo de SPR cuenta con un fotodetector y unas celdas de flujo (o de medida) por donde se hacen pasar las muestras a analizar (sistema de microfluído). Así el sistema de flujo está constituido por las celdas de flujo y por un conjunto de bombas peristálticas que impulsan a las muestras que contienen la molécula complementaria hacia la superficie del sensor donde se encuentra inmovilizado el material biológico.

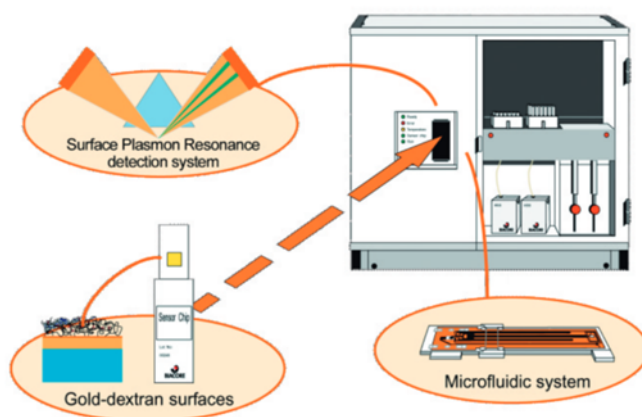


Figura 2. Principales componentes de un biosensor

3. Material biológico y su inmovilización

En función de las características del chip y de la finalidad del experimento, es posible emplear un gran abanico de materiales biológicos que deberán ser inmovilizados para su uso. Tradicionalmente, los elementos de reconocimiento biológicos más utilizados han sido los anticuerpos, precisamente por el gran número de posibilidades que ofrece la técnica.³ Sin embargo, los avances en la instrumentación y las distintas necesidades, han permitido el uso de distintos materiales de reconocimiento biológicos como por ejemplo hebras de ADN, fragmentos de anticuerpos, proteínas más o menos pequeñas, péptidos, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Además, en función del modo de inmovilización, es incluso posible emplear moléculas orgánicas pequeñas en vez de materiales biológicos para llevar a cabo el ensayo.⁴

La inmovilización del material de reconocimiento biológico en la superficie del metal puede realizarse por medio de adsorción física, de forma covalente o por captura mediante interacciones de alta afinidad (Figura 3.A).

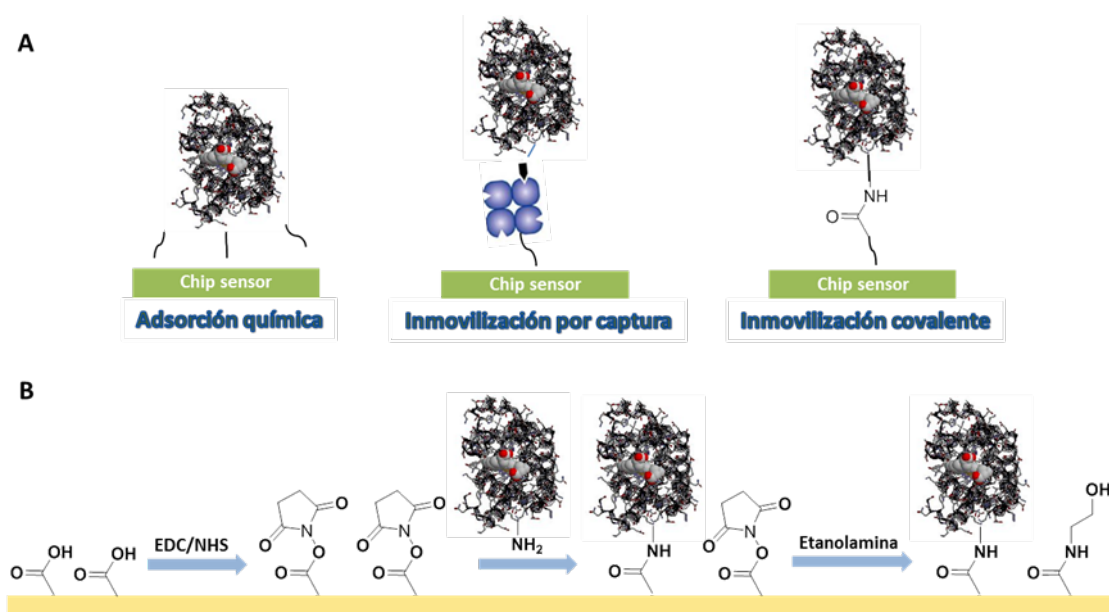


Figura 3. A: Modos de inmovilización para material de reconocimiento. B: Procedimiento de inmovilización covalente de una proteína mediante la formación de un enlace amida con EDC/NHS

La adsorción física es el caso más sencillo de inmovilización ya que no requiere que la superficie de la lámina de oro sea modificada. Sin embargo, presenta como desventajas la escasa estabilidad de la capa formada y la baja reproducibilidad de resultados.

En el caso de inmovilización por captura, la molécula encargada de atrapar a la molécula complementaria es anclada covalentemente a la superficie de oro. Como ejemplo más representativo de este tipo de inmovilización cabe destacar el sistema biotina-estreptavidina.⁵ Debido a la alta afinidad de la estreptavidina por un resto biotinado, la captura resulta prácticamente irreversible favoreciendo su uso en multitud de aplicaciones biotecnológicas.⁶

La inmovilización covalente suele ser el método más empleado ya que permite construir capas más estables con una densidad controlada. Cuando se trabaja con proteínas, la inmovilización suele llevarse a cabo por formación de un enlace amida. Como se muestra en la Figura 3.B, la formación de este tipo de enlace requiere una activación previa del grupo carboxilo con EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida). De esta manera, el ácido activado podrá reaccionar más fácilmente con los grupos amino del material biológico para formar el enlace amida que mantendrá al material biológico inmovilizado en la placa metálica. Con el fin de evitar interacciones no deseadas, es necesaria una última etapa de bloqueo con etanolamina para capar los grupos activados que no han sido capaces de reaccionar con los grupos amino del material de reconocimiento. Cuando la inmovilización a través de grupos amino no funciona bien, existen otras posibilidades de anclaje covalente, como son la inmovilización a partir de grupos aldehído o tiol.

4. Sensograma

Un sensograma es la representación de la variación del ángulo de resonancia (RU) en función del tiempo. En la Figura 4 se muestra un sensograma típico en un experimento de afinidad SPR donde el material biológico está inmovilizado sobre la placa metálica y la molécula complementaria se encuentra en el canal de flujo. El inicio de cada medida consiste en el acondicionamiento con buffer de la superficie del sensor donde se ha inmovilizado el material biológico. Al inyectar la muestra que contiene la molécula complementaria (analito) tiene lugar lo que se conoce como el fenómeno de asociación. A lo largo de esta fase, se puede estudiar a tiempo real el proceso de absorción de las moléculas complementarias sobre el material biológico. Para poder emplear el chip para la siguiente medida, es necesaria una etapa de disociación de las moléculas complementarias y una de regeneración de la superficie del chip que mantenga anclado el material biológico. Esto se consigue haciendo pasar distintas disoluciones de buffer.

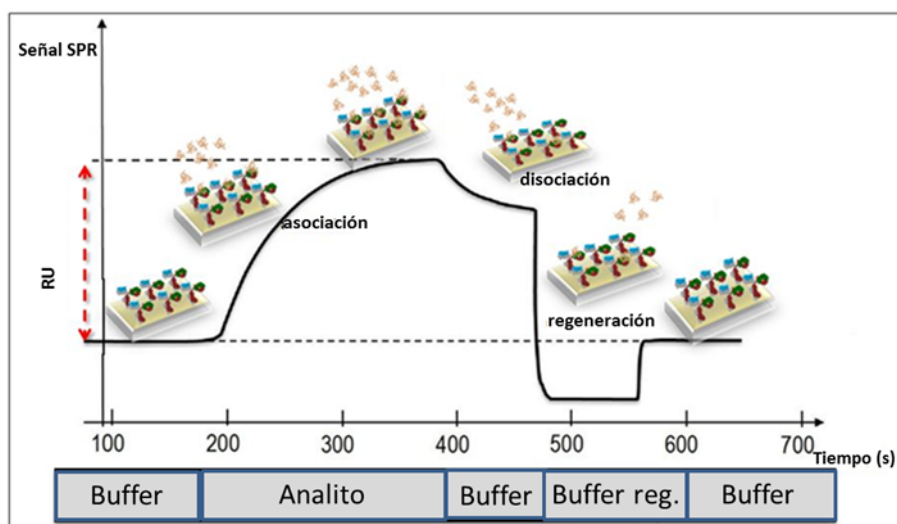


Figura 4. Sensograma obtenido en la monitorización por SPR de la interacción molecular entre el material de reconocimiento y la molécula complementaria

Bibliografía

1. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuators, B* **1999**, *54*, 3-15.
2. Kretschmann, E.; Raether, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch. A* **1968**, *23*, 2135.
3. (a) Bokken, G. C. A. M.; Corbee, R. J.; Van Knapen, F.; Bergwerff, A. A. Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *222*, 75-82; (b) Homola, J.; Dostalek, J.; Chen, S.; Rasooly, A.; Jiang, S.; Yee, S. S. Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *75*, 61-69; (c) Koubova, V.; Brynda, E.; Karasova, L.; Skvor, J.; Homola, J.; Dostalek, J.; Tobiska, P.; Rosicky, J. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sens. Actuators, B* **2001**, *74*, 100-105; (d) Medina, M. B. Hygromycin B Antibody Production and Characterization by a Surface Plasmon Resonance Biosensor. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 389-394; (e) Rasooly, L.; Rasooly, A. Real time biosensor analysis of staphylococcal enterotoxin A in food. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *49*, 119-127.
4. Rich, R. L.; Myszka, D. G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 54-61.
5. Green, N. M. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51-67.
6. Wilchek, M.; Bayer, E. A. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.

